

**В. С. БЕРСЕНЁВА
В. А. БАКУЛЕВ**

СОРБЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ БИОСИНТЕЗА

Учебное пособие

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Уральский федеральный университет
имени первого Президента России Б. Н. Ельцина

В. С. Берсенёва, В. А. Бакулев

СОРБЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ БИОСИНТЕЗА

.....

Учебное пособие

Рекомендовано методическим советом
Уральского федерального университета для студентов вуза,
обучающихся по направлениям подготовки
19.03.01 — Биотехнология, 18.04.01 — Химическая технология

Екатеринбург
Издательство Уральского университета
2018

УДК 544.723:577(075.8)

ББК 24.58я73+28.072я73

Б51

Рецензенты: лаборатория органических материалов Института органического синтеза УрО РАН (завлабораторией канд. хим. наук, ст. науч. сотр. *А. В. Пестов*); д-р фармацевт. наук, проф., завкафедрой фармации УГМУ *А. Ю. Петров*

Научный редактор — канд. хим. наук, доц. *М. Н. Иванцова*

Берсенёва, В. С.

Б51 Сорбционные методы выделения продуктов биосинтеза : учеб. пособие / В. С. Берсенёва, В. А. Бакулев. — Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2018. — 80 с.
ISBN 978-5-7996-2495-8

В учебном пособии рассматриваются особенности молекулярной и ионообменной сорбции, аппаратура для проведения ионообменной сорбции, приведены примеры практического воплощения сорбционных процессов при выделении, очистке и концентрировании растворов продуктов микробиологического синтеза. Учебное пособие предназначено для подготовки студентов, обучающихся по образовательной программе «Химическая технология органических материалов и биологически активных веществ».

Библиогр.: 37 назв. Рис. 31. Табл. 1.

УДК 544.723:577(075.8)

ББК 24.58я73+28.072я73

ISBN 978-5-7996-2495-8

© Уральский федеральный
университет, 2018

Предисловие

Биотехнология является одним из наиболее последовательно и успешно развивающихся направлений науки. Методы и достижения биотехнологии используются для получения множества ценных продуктов, прежде всего лекарственных веществ (антибиотиков, ферментных препаратов, витаминов, гормонов, вакцин, пробиотиков), а также органических кислот, кормовых белков, средств биологической защиты растений, биоудобрений. В настоящее время биотехнология — это не только научная дисциплина, но и производственная сфера, в которой применяются специфические технологии и аппаратное оформление.

Получение биологически активных веществ микробиологическим синтезом — это сложный многостадийный процесс, включающий как продуцирование и накопление продукта биосинтеза, так и выделение целевого продукта из культуральной жидкости или биомассы микроорганизмов. В свою очередь, выделение и очистка целевого вещества проходят как ряд последовательных технологических операций, в результате которых получают препараты фармакопейной степени чистоты.

Знание различных способов выделения продуктов биосинтеза является обязательным для специалиста, дальнейшая деятельность которого будет связана с биотехнологическим производством. Этим объясняется включение в программу бакалавриата направления «Биотехнология» (19.03.01) дисциплины «Методы выделения биотехнологических продуктов», которая входит в модуль «Основы биотехнологических производств».

В последнее время различные аспекты биотехнологии представлены в большом ряду учебников и учебных пособий, однако вопросы выделения и химической очистки продуктов освещены, как правило, недостаточно подробно. Поэтому настоящее учебное пособие, в котором рассмотрены особенности использования молекулярной и ионообменной сорбции для выделения и очистки биотехнологических продуктов, будет полезно студентам при изучении соответствующего раздела курса.

Введение

Выделение продуктов микробиологического синтеза и их химическая очистка — важные этапы технологического процесса, состоящего из нескольких стадий: обработка и фильтрация культуральной жидкости, извлечение целевого продукта из нативного раствора или клеток продуцента, концентрирование продукта и отделение примесей. В результате должен быть получен продукт высокой степени чистоты.

Низкая концентрация продуктов ферментации в нативном растворе (1–2 %) представляет одну из основных проблем при разработке технологий выделения и требует применения методов, обладающих способностью значительно концентрировать вещество. Второй особенностью микробиологического синтеза, затрудняющей процесс выделения, является многокомпонентность культуральной жидкости, содержащей наряду с продуктом биосинтеза и клетками микроорганизмов коллоидные частицы, продукты обмена и автолиза клеток, компоненты питательной среды, различные соли. Следовательно, методы выделения должны отличаться высокой избирательностью.

Наибольшие сложности связаны с тем, что для большинства продуктов биосинтеза (антибиотиков, витаминов, ферментов) под действием внешних условий возможна потеря биологической активности. Этим продуктам свойственна высокая чувствительность к изменениям температуры и величине рН, низкая устойчивость в растворах. Во избежание значительных потерь продукта процессы химической очистки должны проводиться в условиях, максимально обеспечивающих стабильность биологически активных соединений.

Необходимо также учитывать, что методы выделения должны быть технологически приемлемыми в промышленных условиях и достаточно экономичными.

Традиционно для выделения и очистки биотехнологических продуктов используются процессы, которые не сопровождаются резким химическим воздействием на молекулу биологически активного продукта: осаждение, экстракция и сорбция. В последнее время все более

.....

широкое применение приобретают процессы селективного разделения биологических растворов на сорбентах.

Одно из преимуществ сорбционных методов (молекулярной адсорбции, ионного обмена) — возможность в несколько десятков раз сокращать объемы растворов уже на первой стадии очистки, так как сорбция продуктов биосинтеза может производиться с емкостью, составляющей десятки и сотни граммов целевого продукта на грамм сорбента.

Ионный обмен протекает в достаточно мягких условиях при невысоких температурах, то есть практически исключаются инактивирующие воздействия на биологически активные вещества.

Возможность направленного синтеза специфических, избирательно сорбирующих вещества ионообменных смол, большое разнообразие ионитов позволили разработать многочисленные варианты сорбционных методов выделения и очистки разнообразных классов веществ. Развитие теории сорбции и хроматографии открыло новые возможности выбора этого метода как наиболее эффективного для многих биологически активных веществ.

Достоинствами сорбционных методов выделения и очистки продуктов биосинтеза также являются простота аппаратного оформления и высокая экономическая эффективность.

1. Основные сведения о процессе сорбции

Сорбция — один из массообменных процессов, представляющий переход растворенного в жидкой фазе вещества в твердую фазу (**сорбент**). Вещество, которое поглощается твердой фазой, называют **сорбатом**.

Процесс, обратный сорбции, то есть переход поглощенного вещества из сорбента в новый растворитель, называется **десорбцией**.

В зависимости от глубины проникновения сорбата из раствора в сорбент сорбционные процессы делят на абсорбцию и адсорбцию. Проникновение сорбата по всему объему сорбента называется **абсорбцией**. Процесс накопления одного вещества в результате диффузии в поверхностном слое другого вещества на границе раздела фаз называется **адсорбцией**. Можно представить, что адсорбция протекает на активных центрах поверхности: впадинах (а) и выступах (б) (рис. 1). Вещество, на поверхности которого происходит адсорбция, называется **адсорбентом**, а вещество, которое адсорбируется, — **адсорбатом**.

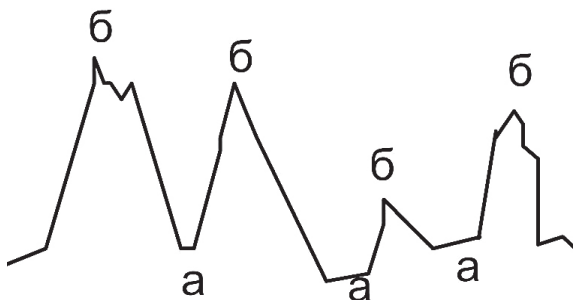


Рис. 1. Рельеф поверхности адсорбции [1]

Различают два типа механизмов сорбционных процессов: физические и химические. Если взаимодействие между адсорбатом и адсорбентом происходит как межмолекулярное взаимодействие и является проявлением физических сил (электростатического взаимодействия, ван-дер-ваальсовой силы), то наблюдается **физическая адсорбция**. В этом случае молекулярные орбитали адсорбата не меняются, моле-

кулы сорбированного вещества сохраняют свою индивидуальность. Физическая адсорбция протекает на активных центрах — впадинах поверхности адсорбции (а) — и носит обратимый характер. С повышением температуры процесса степень физической адсорбции уменьшается.

Если при взаимодействии между адсорбатом и адсорбентом происходят химические процессы (перераспределение электронной плотности, ионно-молекулярное взаимодействие), то имеет место **химическая адсорбция** или **хемосорбция**. При хемосорбции адсорбат реагирует с функциональными группами сорбента, что сопровождается изменением электронных орбиталей обоих участников взаимодействия. Процесс происходит на выступах микрорельефа поверхности (б). Хемосорбция носит специфический и необратимый характер. Повышение температуры приводит к увеличению химической адсорбции.

Адсорбция из растворов на твердом сорбенте бывает двух видов:

- **молекулярная адсорбция** — поглощение из растворов молекул неэлектролитов или слабых электролитов;
- **ионная адсорбция** — избирательное поглощение ионов из растворов электролитов.

Процесс молекулярной адсорбции происходит на неполярных адсорбентах, имеющих гидрофобную поверхность, к которым относятся угли, графит, парафин, тальк.

Ионная адсорбция проходит на полярных адсорбентах с гидрофильной поверхностью: это силикагель, глины, оксиды металлов.

На поверхности твердой фазы одновременно с адсорбцией веществ из растворов происходит процесс поглощения молекул растворителя, который конкурирует с молекулами растворенного вещества за центры адсорбции.

На степень адсорбции влияет природа адсорбента, адсорбата и растворителя. Адсорбция происходит тем полнее, чем ближе полярности адсорбата и адсорбента и чем больше их различие в полярности с растворителем.

Зависимость адсорбции от удельной поверхности адсорбента и концентрации адсорбата в растворе описывается уравнениями Фрейндлиха (1) и Лэнгмюра (2):

$$\Gamma = K_{\phi} c^n, \quad (1)$$

где Γ — адсорбция, моль/г; K_{ϕ} — константа, численно равная адсорбции при равновесной концентрации, равной единице; c — концентра-

ция вещества, моль/л; n — константа, определяющая кривизну изотермы адсорбции, ее значение колеблется в пределах от 0,1 до 0,6;

$$\Gamma = \frac{\Gamma_{\infty} c}{\alpha + c} \quad (2)$$

где Γ — адсорбция, моль/г; Γ_{∞} — предельная адсорбция (количество адсорбата, покрывающего поверхность адсорбента плотным монослоем) — характеризует адсорбционную способность адсорбента; α — константа адсорбционного равновесия (отражает способность адсорбата адсорбироваться и равна отношению констант скоростей десорбции и адсорбции); c — концентрация вещества в растворе, моль/л.

Таким образом, адсорбция характеризуется отношением массы вещества (количества молей), накапливающегося на границе раздела фаз, к единице массы адсорбента (моль/г) или единице площади поверхности раздела фаз (моль/см² или г/см²).

Графически уравнение Лэнгмюра можно представить изотермой адсорбции Лэнгмюра, которая отражает зависимость адсорбции от равновесной концентрации растворенного вещества при постоянной температуре (рис. 2).

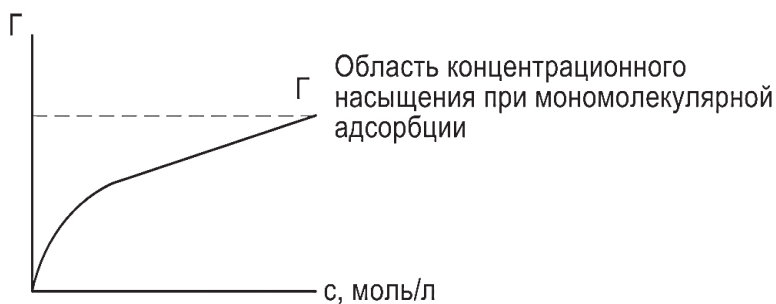


Рис. 2. Изотерма адсорбции Лэнгмюра [2]

Из изотермы следует, что при $c \ll \alpha$ величина адсорбции пропорциональна концентрации. Для нахождения констант уравнения Лэнгмюра (α , Γ_{∞}) кривую изотермы адсорбции следует «спрямить», то есть построить зависимость $1/\Gamma$ от $1/c$.

В случае сильных электролитов, которые в растворах полностью диссоциированы, происходит ионная адсорбция. Различают избирательную и обменную адсорбцию ионов. При избирательной адсорбции сорбируются ионы, имеющиеся в составе решетки адсорбента

или изоморфные им. Поверхность адсорбции заполняется заряженными частицами и приобретает свойственный им заряд. Процесс носит необратимый характер.

При обменной адсорбции к заряженной поверхности электростатически притягиваются оставшиеся в жидкой фазе ионы противоположного знака (противоионы). Противоионы могут обмениваться на другие ионы того же знака.

Наиболее распространенный вид адсорбции сильных электролитов — **ионообменная адсорбция**. Сорбция ионов в этом случае представляет собой гетерогенную химическую реакцию обмена между ионами твердой фазы и ионами, находящимся в растворе, и сопровождается выделением в раствор эквивалентного количества ионов того же знака заряда, которые были сорбированы из раствора.

Ионообменная адсорбция происходит исключительно на поверхности полиэлектролита (**ионита**). Адсорбционная способность ионов (особенно катионов) на данной поверхности возрастает с увеличением их заряда.

Вопросы для самопроверки

1. Назовите термины, используемые для определения процессов и веществ, участвующих в адсорбции.
2. Механизмы адсорбции. В чем отличие физической и химической адсорбции?
3. В чем отличие молекулярной и ионной адсорбции?
4. Зависимость каких величин описывают уравнение и изотерма Лэнгмюра?

2. Основы ионного обмена

В основе метода ионного обмена лежит способность специальных сорбентов (*ионообменных смол*) сорбировать из раствора вещества, имеющие ионную природу (кислоты, основания, соли), за счет *эквивалентного обмена* ионов сорбента и ионов растворенного вещества.

Ионообменные смолы (ИОС) — это высокомолекулярные органические соединения, полученные методом полимеризации или поликонденсации, имеющие сетчатую трехмерную структуру, нерастворимые в воде, но набухающие в ней с образованием гелей. На полимерной углеводородной матрице ионита закреплены *ионогенные группы*, способные к диссоциации. Их природа, количество и заряд определяются, подбираются и регулируются при синтезе ИОС.

Обменный ион, связанный с носителем, называется *фиксированным*. С ним электростатически связан ион противоположного знака — *противоион* или *подвижный ион*. Противоионы подвижны внутри матрицы и могут быть заменены другими ионами с зарядом того же знака.

В зависимости от знака заряда обменивающихся ионов ИОС подразделяются:

- на *катиониты* $\text{RAn}^- \text{H}^+$,
- *аниониты* $\text{RKat}^+ \text{OH}^- (\text{Cl}^-)$,

где RAn^- , RKat^+ — заряженная полимерная матрица, нерастворимая в воде.

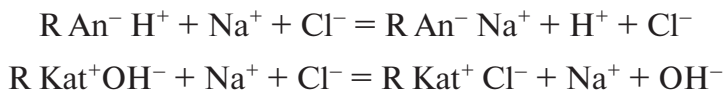
Катиониты представляют собой полимерные поликислоты, содержащие в качестве ионогенных следующие группы: SO_3H^- , PO_3H_2^- , COOH^- , OH^- .

Противоионами в катионитах являются: H^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ .

Аниониты — полимерные полиоснования. Ионогенные группы в анионитах в основном остатки алифатических или ароматических аминов. Противоионами для анионитов служат ионы OH^- либо Cl^- .

Кроме двух основных групп, существуют *амфолиты* (амфотерные полиэлектролиты), обладающие свойствами катионитов и анионитов одновременно.

Таким образом, реакцию ионного обмена можно представить как обратимый стехиометрический обмен ионов двух электролитов в растворе:



2.1. Особенности обмена ионов на ионитах

Схематически процесс ионообмена представляют в виде губки, в порах которой циркулируют противоионы (рис. 3). Активные группы, жестко связанные с полимерной матрицей ионита, называются фиксированными ионами.

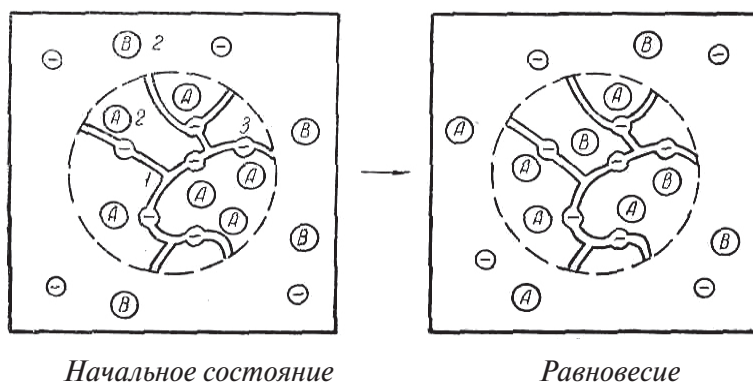


Рис. 3. Схематическое изображение обмена ионами между ионитом и раствором [3]:

1 — матрица с фиксированными ионами; 2 — противоионы; 3 — ко-ионы

Если губка погружена в раствор, то противоионы из пор губки могут перейти в раствор. При этом должна сохраняться электронейтральность, то есть заряд матрицы ионита в каждый момент должен компенсироваться зарядом противоионов. Если появляется возможность участия другого иона в компенсации заряда матрицы, противоион может покинуть губку.

Вместе с противоионами в ионит проникает эквивалентное количество подвижных ионов того же знака, что и заряд матрицы. Эти ионы принято называть ко-ионами.

Если ионит, содержащий только противоионы A , поместить в раствор, содержащий только противоионы B , то будет происходить замещение ионов A ионами B из раствора. В результате наступает состояние ионообменного равновесия, когда ионит и раствор содержат ионы обоих видов в определенном соотношении.

Так как ионогенные группы гидрофильны, то при контакте ИОС с водой эти группы стремятся раствориться. Но, поскольку ионогенные группы прочно связаны с полимером, они стремятся перевести в раствор весь полимер. Этого не происходит, так как полимерная матрица имеет пространственную трехмерную структуру, которая препятствует растворению. Сорбент в большей или меньшей мере набухает, но остается нерастворимым в воде и других растворителях.

Отличие ионообменных материалов от низкомолекулярных кислот и оснований в отсутствии свободной диффузии в раствор катионов или анионов, образующихся в результате диссоциации ионогенных групп. Эти ионы находятся под влиянием электростатического притяжения неподвижного анионного (или катионного) остатка.

Таким образом, процесс ионного обмена складывается из нескольких этапов:

- 1) диффузия ионов растворенного электролита к поверхности сорбента;
- 2) диффузия ионов растворенного электролита внутри зерен ионита;
- 3) химическая реакция двойного обмена;
- 4) вытеснение подвижных ионов из сферы влияния неподвижных ионов;
- 5) диффузия вытесненного подвижного иона из фазы сорбента в раствор.

Так как один из ионов раствора по мере реакции переходит в твердую фазу и выводится из раствора, равновесие реакции сдвигается в нужном направлении.

Скорость многостадийного процесса определяется скоростью наиболее медленной стадии. Скорость реакции ионного обмена очень велика. Большинство экспериментальных данных по ионному обмену, полученных в статических и динамических условиях, показали, что скорость процесса определяется диффузионными стадиями — внешней (1 стадия) или внутренней (2 стадия) диффузией, поэтому скорость ионного обмена весьма существенно зависит от размера зерен ИОС [4].

2.2. Ионообменное равновесие

Состояние ионообменного равновесия характеризуется следующими параметрами: константа ионообменного равновесия, коэффициент распределения и сорбируемость.

Из уравнения реакции обмена двух одновалентных ионов A^+ и B^+



где Z — твердая фаза,

согласно закону действия масс следует, что

$$\frac{[BZ] \cdot [A^+]}{[AZ] \cdot [B^+]} = k_{A,B} \quad \text{или} \quad \frac{[BZ]}{[AZ]} = k_{A,B} \frac{[B^+]}{[A^+]},$$

где $k_{A,B}$ — коэффициент избирательности или константа ионного обмена [3].

Если твердую фазу обозначить чертой сверху, то уравнение примет следующий вид:

$$\frac{[\overline{B^+}]}{[\overline{A^+}]} = k_{A,B} \frac{[B^+]}{[A^+]},$$

то есть отношение масс ионов в твердой фазе (на ионите) пропорционально отношению их масс в растворе.

Поскольку активность обменивающихся ионов — трудно определяемая величина, на практике чаще пользуются **концентрационной константой ионообменного равновесия**:

$$\frac{\bar{C}_A^{1/Z_A}}{\bar{C}_B^{1/Z_B}} = k_{A,B} \frac{C_A^{1/Z_A}}{C_B^{1/Z_B}},$$

где \bar{C}_A, \bar{C}_B — моляльные концентрации обменивающихся ионов в ионите; C_A, C_B — моляльные концентрации соответствующих ионов в растворе; Z_A, Z_B — заряды обменивающихся ионов.

Коэффициент распределения иона (α_B) между раствором и ионитом определяется соотношением

$$\alpha_B = \frac{ZB}{B} \cdot \frac{V}{m},$$

где ZB — количество сорбированного иона B ионитом; B — количество иона B , оставшегося в растворе; V — объем раствора, мл; m — масса ионита, г.

Делением коэффициентов распределения ионов A и B , определяемых при одинаковых значениях V и m , получается **коэффициент разделения** этих ионов

$$\beta = \frac{\alpha_A}{\alpha_B} = \frac{ZA \cdot B}{ZB \cdot A}.$$

Коэффициент разделения служит для количественной оценки способности ионита к разделению противоионов. Он характеризует селективность ионита, то есть предпочтительную сорбцию одного противоиона по сравнению с другим.

Одной из характеристик ионообмена принято считать **обменную способность** или **сорбируемость** ионита (Γ) по определенному иону.

Сорбируемость — это количество ионов, сорбированных единицей веса или объема ионита в равновесных условиях, выражается в миллиграмм-эквивалентах сорбированного иона на единицу веса или объема ионита.

Эта величина обычно определяется путем фильтрования раствора через колонку с известным содержанием исследуемого иона до тех пор, пока не установится равенство концентраций по сорбируемому иону в фильтрате и исходном растворе.

2.3. Свойства ионитов

Для ионообменных сорбентов существует ряд показателей, характеризующих их химические, физико-химические и механические свойства.

Основными показателями для ионитов являются:

- емкость сорбента;
- плотность, набухаемость, влагоемкость;
- гранулометрический состав;
- кривые потенциометрического титрования (позволяют судить о количестве, характере и величине кажущейся pK_a ионообменных групп);

- скорость установления равновесия;
- термостойкость;
- химическая и радиационная устойчивость.

Показатель **обменная емкость** характеризует активность сорбента. Различают полную (ПОЕ), статическую (СОЕ) и динамическую обменную емкость (ДОЕ). Обменная емкость измеряется количеством ионов из раствора, сорбируемых единицей массы. Зависит обменная емкость от числа и типа (сильные, слабые, степень диссоциации) ионогенных групп (чем больше этих групп, тем выше обменная емкость), от строения полимерной матрицы (количество поперечных связей в решетке, от которых зависит размер макромолекулярной сетки полимера) и от природы и концентрации ионов, находящихся в растворе [3].

ПОЕ — полное число всех ионогенных групп, имеющихся в единице веса или объема материала. Эта величина постоянна для данного образца материала. Она не зависит от температуры, концентрации и природы обменивающихся ионов, крупности зерен материала.

СОЕ — количество ионов, сорбированных единицей веса или объема материала в равновесных условиях. Величина СОЕ зависит от многих факторов: концентрации и природы сорбированных ионов, температуры опыта и крупности зерен. Она служит для предварительной оценки сорбционной способности материала по отношению к данному иону.

ДОЕ — количество сорбированных ионов в динамических условиях, отнесенное к единице веса или объема материала. Определяется целью и условиями проведения опыта, зависит от тех же факторов, что и СОЕ, а также от скорости прохождения раствора через сорбент. Отношение ДОЕ и ПОЕ служит мерой полноты использования материала.

Существуют общие требования, которым должны отвечать ионообменные материалы:

- достаточно высокая обменная способность при заданном рН среды;
- высокая скорость установления ионообменного равновесия;
- избирательность по заданному иону;
- определенные размеры макромолекулярной решетки, что определяет степень набухаемости сорбента;
- химическая устойчивость и механическая прочность.

В некоторых случаях ионообменные материалы должны быть устойчивыми к высоким температурам и радиоактивному излучению. Как правило, материалы должны быть достаточно дешевы и обладать стабильными характеристиками на протяжении всего срока службы.

Области применения ионообменных материалов очень разнообразны. Поэтому, кроме перечисленных выше, к ионообменным сорбентам предъявляются еще специфические требования. Например, хорошая электропроводность, высокая селективная ионопроницаемость, т. е. способность пропускать только ионы одного знака заряда, эластичность, гибкость и водонепроницаемость.

2.4. Классификация ионообменных материалов

Большое многообразие ионообменных смол требует объединения их в группы по тем или иным признакам [3, 5].

Классифицировать иониты можно по химической катионообменной или анионообменной функции, по структуре активных групп, по структуре матрицы и т. д.

Как высокомолекулярные кислоты и основания, иониты могут быть разделены на четыре типа в зависимости от степени диссоциации:

- 1) иониты, проявляющие свойства сильных кислот и оснований, — **сильнокислотные катиониты и сильноосновные аниониты**;
- 2) иониты, проявляющие свойства слабых кислот и оснований, — **слабокислотные катиониты и слабоосновные аниониты**;
- 3) иониты смешанного типа, проявляющие одновременно свойства смеси сильной и слабой кислот или сильного и слабого основания;
- 4) иониты, обменная емкость которых непрерывно возрастает по мере повышения pH (для катионитов) и pOH (для анионитов) в широком интервале их значений.

Сильнокислотные катиониты характеризуются легкостью вытеснения из них ионов водорода различными другими катионами, что связано с высокой степенью диссоциации поликислоты ионита. К сильнокислотным относятся катиониты, содержащие в качестве ионогенной группы остатки серной (SO_3H) или фосфорной (PO_3H_2) кислот.

Зависимость обменной емкости катионита по ионам металла (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} и др.) от pH раствора показана на рис. 4. Обменная ем-

кость сильнокислотного катионита почти не зависит от рН раствора и сразу достигает своего предельного значения. При дальнейшем увеличении рН количество сорбированных ионов металла остается постоянным.

Сильноосновные аниониты в качестве ионогенных групп содержат четвертичные аммонийные или пиридиниевые основания, а также четвертичные фосфониевые группы. Они способны к обмену ионов в кислой, нейтральной и щелочной среде и характеризуются легкостью обмена гидроксил-иона на анионы различных кислот (NO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} и др.).

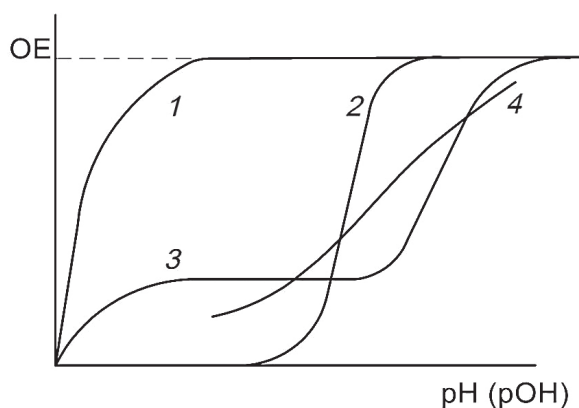


Рис. 4. Кривые, хаактеризующие зависимость обменной емкости ионита от значения рН (или рОН) равновесного раствора [5]:

1 — иониты со свойствами сильных кислот или оснований; 2 — иониты со свойствами слабых кислот или оснований; 3 и 4 — иониты смешанного типа

Слабокислотные катиониты характеризуются тем, что катионы многих металлов, особенно щелочных и щелочноземельных, почти не способны сорбироваться с вытеснением из сорбента ионов водорода при низких значениях рН растворов. Для растворов с более высоким значением рН обменная емкость начинает увеличиваться, достигая предельного значения Γ_o (рис. 4). Положение области возрастания величины обменной емкости на оси абсцисс зависит от концентрации иона металла в растворе и природы ионита: чем слабее выражены его кислотные свойства, тем более высоким значением рН соответствует подъем кривой 2. Активными группами катионитов 2-го типа могут быть различные группы, характерные для слабых кислот (карбоксильная — COOH , фенольная — OH).

Слабоосновные аниониты содержат первичные $-\text{NH}_2$, вторичные $-\text{NHR}$ и третичные $-\text{NR}_2$ аминогруппы и обменивают ионы только в кислой и частично нейтральной среде. Обменная емкость таких ионитов при сорбции из нейтральных и щелочных растворов незначительна (рис. 4). Положение области возрастания зависит от силы анионита как основания: чем более слабым основанием является анионит, тем более кислым растворам соответствует эта область.

Третий тип — иониты смешанного типа, проявляющие свойства смеси сильной и слабой кислот или, соответственно, оснований. Иониты этого типа обладают двумя предельными значениями обменной емкости в зависимости от pH или pOH раствора (кривая 3, рис. 4).

Иониты, относящиеся к четвертому типу, ведут себя подобно смеси многих кислот или оснований различной силы. Обменная емкость таких ионитов с ростом pH или pOH непрерывно возрастает и близка прямой (рис. 4). Для ионитов этого типа часто невозможно найти предельное значение обменной емкости.

В зависимости от природы матрицы ионообменного сорбента иониты разделяют на неорганические (минеральные) и органические. Характер матрицы определяет многие свойства ионитов: набухаемость, химическую устойчивость в растворах кислот и щелочей, доступность ионогенных групп отдельных зерен и т. д.

К **природным минеральным ионитам** относятся кристаллические силикаты: цеолиты, глинистые минералы, полевые шпаты. Природные алюмосиликаты, как правило, проявляют катионообменные свойства. Единственным природным анионитом, который когда-либо находил практическое применение, является апатит $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3]\text{F}$ и гидроксилapatит $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3]\text{OH}$.

К **синтетическим неорганическим ионитам** помимо синтетических цеолитов, пермутитов и силикагелей относится большая группа различных нерастворимых химических соединений, обладающих ионообменными свойствами: гранулированные окиси и гидроокиси алюминия, цинка, железа, олова, титана, циркония, ниобия и других металлов, сульфиды, фосфаты, смешанные ферроцианиды, гетерополикислоты. Большое практическое применение нашли иониты на основе окиси и фосфата циркония. В зависимости от состава и кислотности среды синтетические неорганические иониты могут работать как катиониты, аниониты или амфолиты.

Органические иониты природного происхождения — это почвы, некоторые угли, продукты сульфирования и фосфорилирования угля, торфа, лигнина и целлюлозы. Природные вещества органического происхождения обычно применяются после предварительной химической обработки.

Наиболее широкое применение в промышленности получили **синтетические ионообменные смолы**, характеризующиеся большой химической и механической прочностью, высокой обменной емкостью, высокой селективностью.

Существует несколько систем обозначения ионообменных смол. Смолы, выпускаемые в Российской Федерации обозначаются следующим образом:

КУ — сильноокислотные, сернокислотные катиониты (катионит универсальный);

КФ — катионит фосфорнокислый;

КБ — слабокислые катиониты (катионит буферный);

АВ — аниониты высокоосновные, сильноосновные;

АН — аниониты низкоосновные, слабоосновные.

Цифра, стоящая после этих букв, является порядковым номером разработанной марки. Иногда после цифры стоит буква «Г», которая характеризует сферическую (гранульную) форму зерен ионита.

Многие ионообменные смолы выпускаются с различным содержанием сшивающего агента, например дивинилбензола. Содержание сшивающего агента в смоле обычно указывается цифрой после значка «Х». Например, КУ-2Х12 означает: катионит сильноокислотного типа, содержащего соответственно 12 % дивинилбензола. Как за рубежом, так и в РФ иногда ионообменные смолы обозначаются произвольно, например НО, ВС, ММГ и т. д.

К числу сильноокислых катионитов относятся синтетические смолы КУ-2, КУ-3, КУ-4, СДВ-2, СДВ-3, АР. Сочетание «СДВ» указывает на то, что катионит получен сополимеризацией стирола и дивинилбензола.

К анионитам первого типа относятся синтетические смолы АВ-16, АВ-17.

Катионитами второго типа являются силикагель, стекло ЭС-1, применяемое для изготовления стеклянных электродов, а также синтетические смолы КБ-4, КБ-4 П2, СГ-1.

Слабокислые аниониты представлены синтетическими смолами ЭДЭ-10 П, АН-2 Ф, АН-1, ММГ-1 и НО.

Вопросы для самопроверки

.....

1. Какими параметрами характеризуется ионообменное равновесие?
2. Какими показателями характеризуются иониты?
3. Какие характеристики ионита определяют обменную емкость сорбента?
4. Каким требованиям должны отвечать ионообменные материалы?
5. Какие функциональные группы обеспечивают обменные свойства различных синтетических ионообменных смол?
6. Как классифицируют ионообменные смолы?

3. Синтез ионообменных смол

В основе синтеза ионообменных смол лежат реакции полимеризации и поликонденсации, которые применяются в синтезе полимеров.

Наиболее важные свойства ионообменных смол (обменная емкость, химическая стойкость, механическая прочность и др.) в значительной степени определяются химической природой и структурой полимерного каркаса смолы.

Так, для эффективного ионного обмена очень большое значение имеет проницаемость зерен ионита по отношению к сорбируемым ионам, а для проницаемости зерен ионита — степень его набухаемости.

Способность ионообменных сорбентов набухать в водных растворах выражается коэффициентом набухания ($K_{\text{наб}}$). Коэффициент набухания для ионитов определяется как отношение объема набухшего в воде ионита (V_1) к объему сухого ионита (V_2) [3]:

$$K_{\text{наб}} = V_1/V_2$$

У производственных сорбентов $K_{\text{наб}}$ обычно равен 3–4.

Набухаемость ионита определяется химической природой макромолекулярного каркаса, а именно размером ячейки макромолекулярной решетки. Чем больше размер ячейки, тем более проницаема смола для крупных ионов, но, с другой стороны, увеличение размеров ячеек приводит к понижению механической прочности ИОС.

В зависимости от способа образования молекулы полимера иониты бывают полимеризационного или поликонденсационного типа. Ионогенные группы могут содержаться в мономерах или вводиться в уже готовые полимеры.

В связи с этим существует два метода синтеза ИОС:

- 1) полимеризация или поликонденсация мономеров, содержащих в своих молекулах ионогенные группы;
- 2) синтез полимера, а затем проведение химической реакции с целью введения ионогенных групп.

Для создания трехмерной макромолекулярной матрицы поликонденсационных ионитов используют органические вещества, содержащие в молекуле не менее *трех* реакционноспособных групп или атомов, т.е. трехфункциональные мономеры (фенол, анилин, меламин и др.), которые при реакции конденсации, например, с формальдегидом дают нерастворимые полимеры, содержащие ионогенные группы.

При получении ИОС полимеризационного типа обычно используют винильные или другие двухфункциональные мономеры, но в этом случае для сшивки линейных полимеров и создания поперечных связей проводят сополимеризацию с дивинильными мономерами — кросс-агентами (дивинилбензолом, диметакриловым эфиром этиленгликоля).

При синтезе полимеров можно регулировать размеры ячеек макромолекулярного каркаса путем подбора подходящего кросс-агента, а также изменением количественного соотношения между кросс-агентом и мономером, участвующим в построении линейной цепи полимера. При синтезе среднесшитых ИОС добавляют 8–10 % дивинилбензола, при получении слабосшитых смол количество дивинилбензола составляет не более 0,5 %, а при синтезе сильносшитых смол может быть увеличено до 24 %.

Проницаемость ионита и размеры ячейки можно регулировать путем обрыва линейной цепи полимера. Обрыв достигается за счет использования телогена — вещества, тормозящего рост цепи. Полученные таким образом иониты состоят из коротких линейных цепочек и отличаются микропористостью.

Процессы полимеризации или поликонденсации при получении полимерных ионитов можно проводить блочным или суспензионным способом. В первом случае при дроблении блоков получают зерна смолы неправильной формы. При суспензионной полимеризации или поликонденсации получают гранулы правильной сферической формы. Они могут быть применены в ионообменных колоннах без дополнительной обработки.

Важным моментом в технологии является получение макропористых ионитов. Они получают введением в реакционную массу в процессе полимеризации инертного растворителя, который захватывается массой, а затем удаляется уже из пространственного полимера. Получается ионит в виде затвердевшей губки. Макропористые иониты содержат каналы с диаметром пор около 100 нм, тогда как у ионитов с натуральной пористостью диаметр пор составляет около 1 нм (рис. 5).

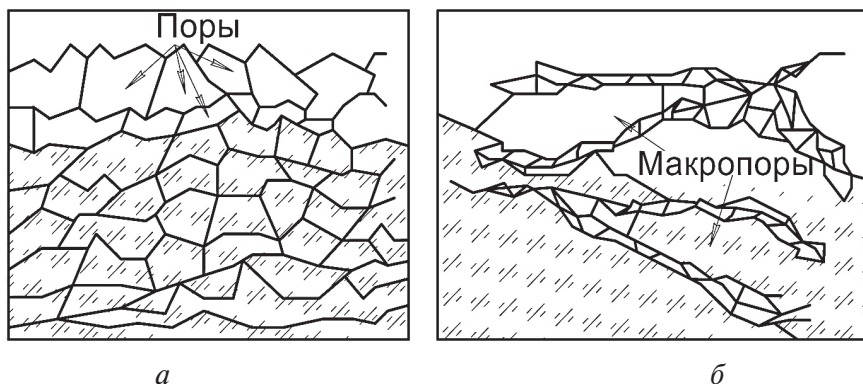


Рис. 5. Схема матриц ионитов обычной (а) и макропористой (б) структуры

Макропористые ИОС имеют повышенные кинетические характеристики по сравнению с обычными ионитами, т. к. поры облегчают диффузию ионов к активным центрам, отличаются высокой механической прочностью и осмотической стабильностью.

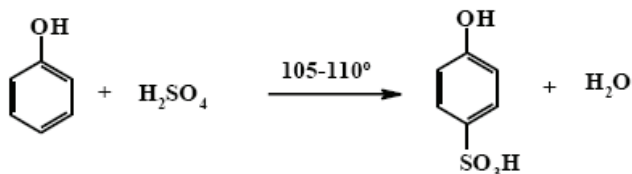
Получение сильнокислотных катионитов

Сильнокислотные катиониты в качестве ионогенных групп содержат $-\text{SO}_3\text{H}$ группы. Наибольшее распространение получили сульфокатиониты КУ-1, КУ-2, СДВ-3, Дауэкс-50 и др.

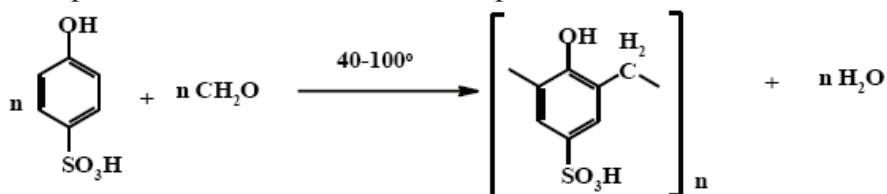
Сульфогруппа ($-\text{SO}_3\text{H}$) легче всего вводится в ароматические углеводороды и их производные, поэтому для синтеза сульфокатионитов в качестве сырья используется доступное ароматическое сырье: фенол, стирол и т. п.

Синтез КУ-1, катионита поликонденсационного типа, состоит из следующих стадий [3].

1. Сульфирование фенола

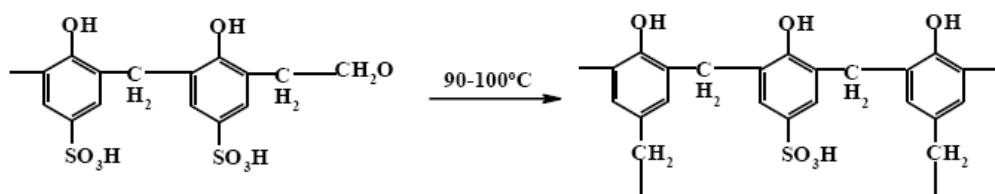


2. Образование линейного полимера



Реакция с формальдегидом приводит к образованию поперечных связей заменой части сульфогрупп фенолформальдегидными. Полученный полимер отличается большей механической прочностью и хорошей набухаемостью.

3. Кросс-конденсация — образование трехмерного пространственного полимера

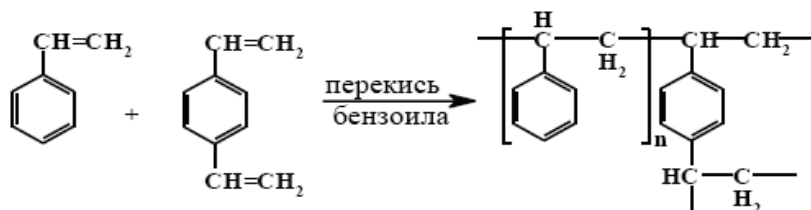


Катионит КУ-1 применяется для очистки воды, соков, гидролизных растворов, при разделении алкалоидов.

Широко применяют следующие сульфифенолформальдегидные смолы: немецкие Вофатиты Р и D, английские Цеокарб-215 и Цеокарб-315, американские Амберлайт IR-1, Q-100, Дуолайт С-10 и С-3, Дауэкс-30. Они отличаются порядком операций сульфирования и поликонденсации, технологией получения, иногда используются другие фенолы.

Сильнокислотные катиониты полимеризационного типа получают в настоящее время чаще всего на основе сополимера стирола с дивинилбензолом (ДВБ). Ионогенные группы вводят в готовый сополимер, так как сульфирование мономерного стирола может сопровождаться реакцией полимеризации под действием серной кислоты.

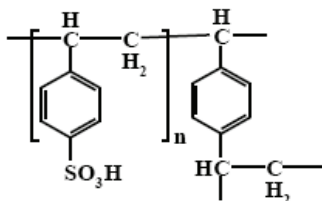
Реакция стирола и дивинилбензола проходит в присутствии инициатора, например перекиси бензоила. При этом образуется пространственная структура сополимера:



Изменив соотношение между количеством стирола и ДВБ, можно регулировать расстояние между поперечными связями. Если проводят полимеризацию стирола с 2 % ДВБ, то получают сетчатый полимер, в котором на каждые 55 звеньев стирола приходится 1 звено ДВБ, а при 4 % ДВБ поперечные связи расположены через 20–30 звеньев.

Сополимеризацию стирола с ДВБ проводят суспензионным способом, и сополимер получают в виде гранул определенного размера.

Сульфирование сополимеров проводят в дихлорэтано в мягких условиях, что позволяет сохранить форму сферических гранул. Катиониты имеют следующее строение:

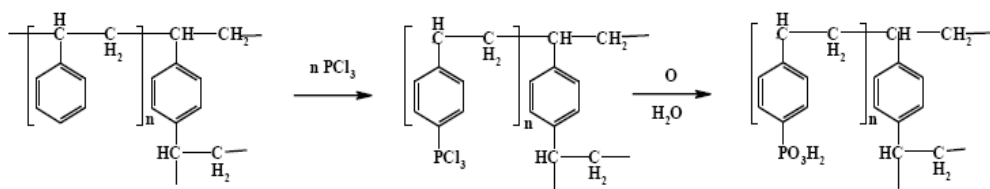


Подобным образом получают катиониты КУ-2, СДВ, Дауэкс-5 с различным содержанием ДВБ, для которых характерна высокая скорость установления сорбционного равновесия, высокая химическая стойкость и достаточная механическая прочность. Эти марки катионитов находят применение как в промышленности, так и для хроматографии в лабораторных исследованиях.

Катионит КУ-2—20, содержащий 20 % ДВБ (плотнотесный), используется в производстве антибиотиков: для обеззоливания элюатов (удаления Ca^{+2} , Mg^{+2}) в производстве стрептомицина, канамицина.

В практике ионного обмена применяется также смола СБС — стиролбутадиеновая смола, содержащая 13,1 % ДВБ и ионогенную группу $-\text{SO}_3\text{H}$. Применяется для сорбции окситетрациклина, для обеззоливания элюатов.

На основе сополимера стирола и ДВБ можно получить и фосфорнокислые катиониты, например КФ-1:



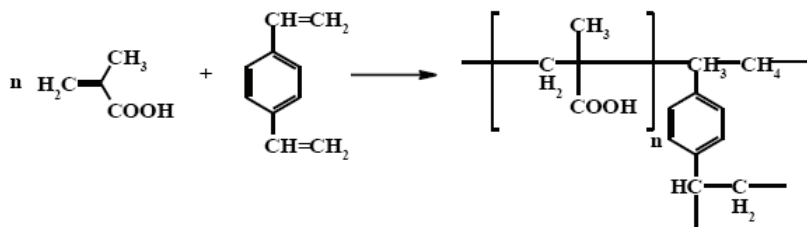
Известны фосфорнокислые катиониты и конденсационного типа. Кроме остатков серной и фосфорной кислот катиониты могут содержать в качестве ионогенных групп и остатки мышьяковой кислоты.

Получение слабокислотных катионитов

Слабокислотные катиониты в большинстве случаев содержат в своей структуре карбоксильные группы ($-\text{COOH}$), иногда фенольные гидроксилы ($-\text{OH}$).

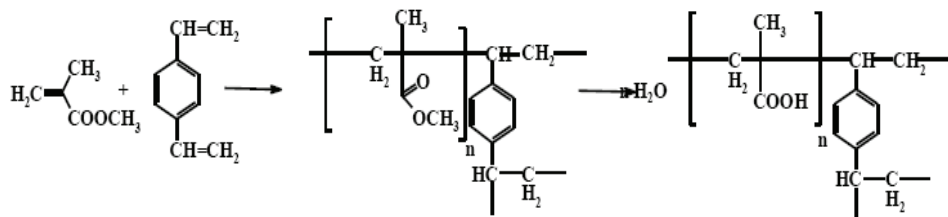
Наиболее часто катиониты, содержащие в качестве ионогенных групп карбоксилы и отличающиеся высокой химической устойчивостью, получают совместной полимеризацией ненасыщенных органических кислот с дивинилбензолом или каким-либо другим кросс-агентом.

Например, катиониты КБ-1 можно получить при сополимеризации метакриловой кислоты с ДВБ по схеме [3]:



Такие смолы обладают невысокой механической прочностью, так как сополимер нерастворим в мономере и процесс сополимеризации трудно контролируется.

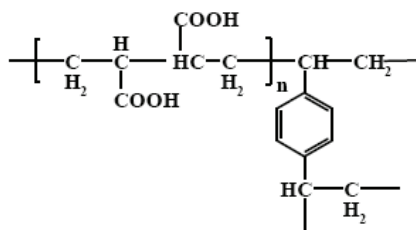
В этом случае сополимеризации ДВБ и метилового эфира метакриловой кислоты с последующим гидролизом сополимера процесс легко регулируется при различных соотношениях компонентов. Образуются прочные прозрачные гранулы катионита:



По этой схеме получают катиониты КБ-4, КБ-4-П2, КБ-2, используемые в производстве антибиотиков для извлечения из нативных растворов антибиотиков-аминогликозидов и полипептидов. Катионит КБ-4-П2 содержит 2–3 % ДВБ (слабосшитый катионит) и служит для сорбции стрептомицина, канамицина, гентамицина, полимиксина и некоторых других антибиотиков.

Для тех же целей применяется смола КБ-2 (содержание ДВБ 2–3 %). Особенностью катионита КБ-2 является попарное расположение карбоксильных групп (сополимеризация происходит таким образом, что эфиры акриловой кислоты вступают в соединение друг с другом по типу «голова к голове»), что придает ИОС селективность по отно-

шению к двухвалентным катионам. Структурное звено смолы можно изобразить следующим образом:



Можно варьировать соотношение «ненасыщенная кислота — диен», использовать другие мостикообразующие диены и получать карбоксилсодержащие иониты, отличающиеся друг от друга разрыхленностью структуры, и таким образом определять степень проницаемости при сорбции ионов молекул различных размеров.

Кроме сорбции антибиотиков карбоксилсодержащие катиониты с успехом применяются при хроматографическом анализе сложных смесей.

Получение сильноосновных анионитов

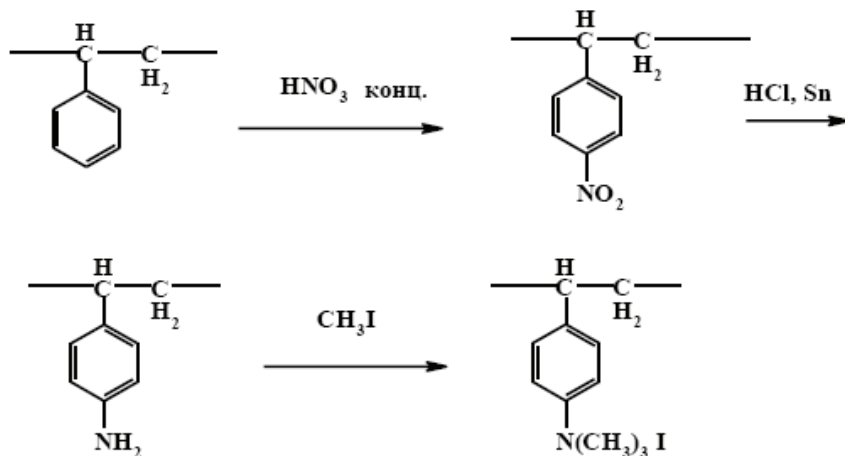
Сильноосновные или высокоосновные аниониты содержат четвертичные аммониевые группы, способные к обмену анионов в кислой, нейтральной и даже щелочной среде.

Высокоосновные аниониты, содержащие четвертичные аммониевые группы, можно получить как конденсацией аминов, например с формальдегидом и последующим алкилированием аминогруппы, так и путем полимеризации ненасыщенных соединений, содержащих аммониевые группы.

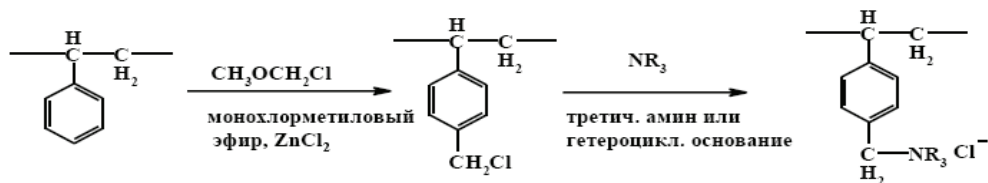
Основным методом получения высокоосновных анионитов, обладающих хорошими сорбционными свойствами и достаточной химической и механической прочностью, является метод сополимеризации. Этим методом получают полимеры с относительно регулярной структурой макромолекул, есть возможность регулировать степень проницаемости анионитов путем подбора подходящих исходных веществ и условий проведения сополимеризации. Кроме того, полимеризационные аниониты легко получить монофункциональными.

Для получения высокоосновных анионитов в качестве сырья применяют сополимер стирола с ДВБ, который превращают в сильноосновный анионит двумя способами [3].

Во-первых, это последовательность реакций нитрования, восстановления и алкилирования сополимера стирола с ДВБ или другими диенами:

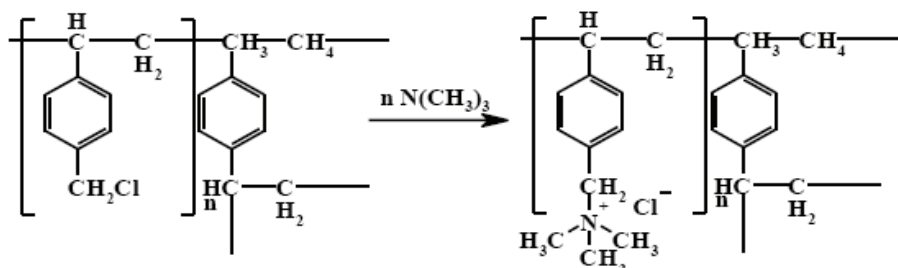


Второй метод — хлорметилирование сополимера стирола с дивинилбензолом с последующим аминированием:

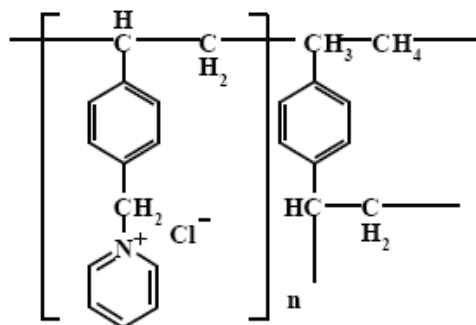


В зависимости от применяемого амина получают различные марки анионитов, содержащие однотипные ионогенные группы. Внутримолекулярную пористость смолы можно регулировать, изменяя процент «сшивки» ДВБ. Именно этот метод применяется на практике.

При взаимодействии хлорметилированного сополимера стирола и ДВБ с триметиламином получают сильноосновный анионит АВ-17:

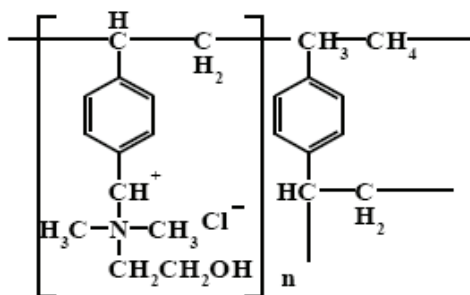


Анионит АВ-18 получается при обработке сополимера, содержащего хлорметиленовый заместитель пиридином:



Аниониты АВ-17, АВ-18, как правило, используются в производстве антибиотиков для удаления из элюатов после стадии сорбции-десорбции пигментных примесей (гуминовых кислот).

Если в качестве основания используется диметилэтанолламин, то получаются анионообменные смолы, Амберлайт IRA и Дауэкс-2, выпускаемые в США:

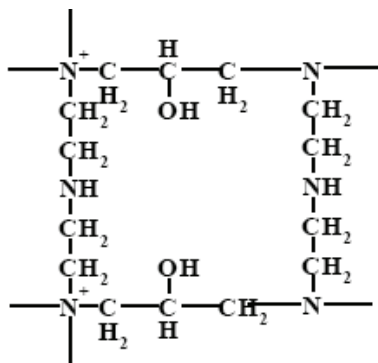


Получение слабоосновных анионитов

В производстве антибиотиков и для ионообменной хроматографии чаще всего применяется такой слабоосновный анионит, как смола ЭДЭ-10 П, получаемая реакцией поликонденсации эпихлоргидрина с различными полиаминами (ПЭПА).

ЭДЭ-10 П — полифункциональный анионит, содержит вторичные, третичные аминогруппы и четвертичные аммониевые группировки (10–12% от общего числа аминогрупп).

Элементарное звено анионита:



Анионит химически устойчив к кислотам и щелочам, к азотной кислоте до 1N концентрации, способен давать комплексы с некоторыми тяжелыми металлами. Применяется при водоподготовке (получение обессоленной воды), для очистки сахарных сиропов и других целей.

4. Современные подходы к синтезу и структуре ионообменных материалов для сорбции биологически активных веществ

Целенаправленный синтез ионитов для сорбции биологически активных веществ планируется таким образом, чтобы получаемый сорбент был гидрофилен, высокопроницаем для БАВ и имел функциональные группы для ион-ионных взаимодействий, подобных тем, которые существуют в биологических системах. Это преимущественно карбоксильные, фосфонисто- и фосфоновокислые группы и аминокгруппы разной степени основности [4].

Кроме того, локальное расположение неионогенных полярных и гидрофобных сорбционных центров, окружающих ионогенные группы, должно соответствовать возможностям целевого вещества участвовать в дополнительных межмолекулярных взаимодействиях.

Для целенаправленного синтеза ионитов, предназначенных для сорбции продуктов биотехнологии, используют набор мономеров, различающихся как функциональными группами, так и реакционной способностью.

Для повышения гидрофильности и биосовместимости некоторых сополимеров применяют кросс-агенты, в которых вместо алифатического среднего участка встроены короткие цепи полиэтиленгликоля. Так, в катионите СГ-1 м сшивающим агентом является триэтиленгликоль-диметакрилат (рис. 6) [6].

Полимеризация моновинильных мономеров ведет к образованию линейных цепей, а сочетание моно- и поливинильных мономеров завершается образованием разветвленной полимерной сетки. Такой полидисперсный ансамбль разветвленных полимеров принято называть зо́лем.

Использование сшивающего агента в количестве 0,5–1,0 мол. % придает структуре ионита проницаемость для аминокислот, антибиотиков и олигопептидов.

Хорошая проницаемость для белковых макромолекул, макромолекулярных комплексов и вирусов позволяет использовать эти иониты

для выделения этих компонентов из естественных источников и концентрирования в процессе хроматографического разделения. Сорбционное равновесие по отношению к макромолекулярным комплексам и вирусным частицам в этих системах достигается за несколько часов [6].

Дивинильные кросс-агенты, представленные на рис. 5, имеют функциональность 4, так как в качестве узлов полимерной сетки объединяют 4 линейных цепи моновинильных звеньев. Тривинильные сшивающие агенты соединяют 6 линейных цепей, как гексагидро-1,3,5-триакрилоилтриазин (ГТА), за счет которых в полимерной сетке образуются химические узлы «звездчатой» структуры. Такие полимерные сетки могут быть использованы при синтезе как катионитов, так и анионитов.

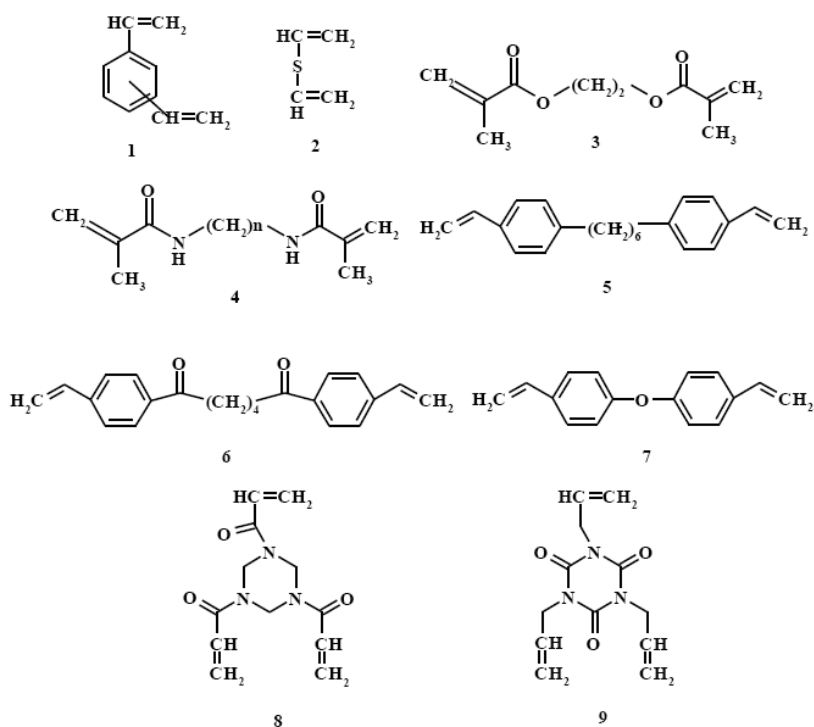


Рис. 6. Структуры сшивающих мономеров (кросс-агентов), применяемые при синтезе ионитов, предназначенных для сорбции биологически активных веществ:

- 1 — ДВБ, 2 — ДВС, 3 — *N, N*-этиленгликоль-диметакрилат (ЭДМА),
 4 — *N, N*-алкилендиметакриламид (АДА), 5 — бис-(*n*-винилфенил)гексан (БВФГ),
 6 — бис-(*n*-винилбензоил)бутан (БВББ), 7 — бис-винилфениловый эфир (БВФЭ),
 8 — гексагидро-1,3,5-триакрилоилтриазин (ГТА),
 9 — три-аллилизотиоцианурат (ТАИЦ)

Использование метакрилоильных производных *n*-аминосалициловой или бензойной кислоты в качестве ионогенных мономеров позволяет получить иониты с повышенной жесткостью полиэлектролитных цепей и аномальной зависимостью объемного набухания конечной структуры.

Сополимеризация акриловых кислот в присутствии триаллилизотиоцианурата (ТАИЦ) проходит в две стадии. Вначале за счет связывания одной из аллильных групп образуется золь-фракция сополимера, затем при участии второй и третьей аллильных групп происходит формирование неоднородной гелевой структуры. При этом варьирование концентрации сшивателя в смеси позволяет увеличить неоднородность геля до клеточной морфологии.

Таким образом, формируется пространственно сшитая сетка полиэлектролитных цепей с той или иной степенью неоднородности, проницаемость которой определяют следующие факторы:

- различие реакционной способности ионогенных мономеров и сшивающих агентов и их относительное содержание в исходной смеси;
- качество и концентрация растворителя/разбавителя в исходной смеси;
- разница растворимости мономеров и сополимера в растворителе реакционной среды.

Безэмульгаторной эмульсионной сополимеризацией были получены микросферы, содержащие на поверхности центры химического связывания биологически активных веществ. Для этих целей был разработан метод регулировки размера частиц, образующихся в процессе полимеризации метилметакрилата под действием 4-азо-бис-4-(цианизо)валериановой кислоты, при варьировании концентрации буферных солей.

В качестве полимерного стабилизатора формируемых частиц применяли карбоксилированные производные декстрана или его полиальдегид. Подобные стабилизаторы существенно ускоряют процесс полимеризации и могут образовывать привитые сополимеры с полиметилметакрилатом. Это позволяет включать в поверхностный слой частиц реакционноспособные группы. Такие частицы могут эффективно связывать на поверхности белковые макромолекулы с образованием оснований Шиффа.

Сложные природные смеси — культуральные жидкости микроорганизмов, физиологические жидкости, экстракты растительных и жи-

вотных тканей — характеризуются не только сложным многокомпонентным составом, но и повышенной вязкостью и присутствием коллоидных частиц, что требует определенных условий их переработки.

В частности, для сорбционных процессов требуются такие пористые материалы, которые обеспечивают протекание раствора через сорбент без механического засорения последнего. Для этих процессов сорбенты могут быть синтезированы не только в виде сферических микрочастиц, но и в форме пористых блоков — фильтрующих элементов, состоящих из спаянных микрочастиц (пространственно-глобулярные структуры) с ионообменными свойствами (ПГС-иониты). Их получают как радикальной сополимеризацией, так и поликонденсацией фенолформальдегидного типа в виде изделий разной формы: пластин, колонок и трубок. Средний размер микроглобул составляет 1 мкм, а сквозные поры между глобулами имеют диаметр 2–5 мкм. Первое преимущество этих сорбентов перед традиционными зернистыми материалами состоит в том, что отпадает проблема упаковки сорбента в колонку: блоки состоят из рыхло упакованных сорбирующих микрочастиц, положение которых фиксировано. Второе преимущество определяется тем, что раствор протекает через капилляры с диаметром пор в несколько микрон, что снимает диффузионное лимитирование массопереноса.

Радикальной полимеризацией стирола с дивинилбензолом с последующим сульфированием полученного пенистого полимера хлорсульфоновой кислотой был получен катионит, ионообменная емкость которого достигала 4,8 мг-экв/г.

Большинство пористых ионитов промышленных марок имеют на поверхности гранул уплотненный слой сополимера, толщина которого зависит от размера гранулы. Например, крупные гранулы многих карбоксильных катионитов отличаются плотной морщинистой поверхностью, а мелкие гранулы — более гладкой. И в том, и в другом случае эти поверхностные слои лимитируют проницаемость БАВ. В то же время скол обнаруживает внутри гранулы развитую пористую структуру, которая высоко проницаема по отношению к макромолекулярным БАВ. Примером может служить скол гранулы катионита СГК-7, представленный на рис. 7 [4].

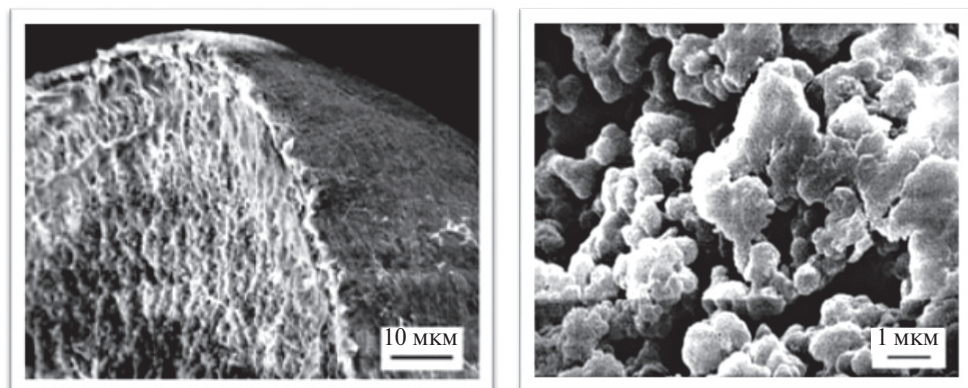


Рис. 7. Морфология катионита SGK-7, характерная для гранулярных сшитых структур (по данным растровой электронной микроскопии) [6]:

слева — поверхность, справа — скол гранул

Несмотря на разнообразие мономеров, которые могут быть использованы для синтеза ионообменных материалов, наиболее перспективным является синтез сополимеров, позволяющих получать катиониты, аниониты или полиамфолиты на основе одной и той же пористой полимерной матрицы.

Использование специальных мономеров и условий сополимеризации позволяет сохранять реакционноспособные группы на поверхности сшитого сополимера с целью дальнейшей его модификации.

Наличие эпоксидных групп в матрице сшитого сополимера открывает возможности разнообразных способов модификации этих материалов. Примером такого подхода является синтез сшитого сополимера глицидилметакрилата (ГМА), представленный на рис. 8 [6].

Эпоксидные группы, принадлежащие сшитым цепям сополимера, позволяют путем модификации преобразовать сополимер в анионит с первичными аминогруппами или в карбоксильный катионит. Аминолиз исходного сополимера проводят в 25 %-ном водном растворе аммиака при 80 °С в течение 4 ч и получают анионит ГМА, щелочной гидролиз сополимера в растворе 6,5 М натриевой щелочи при 100 °С в течение 4 сут и получают катионит ГМК.

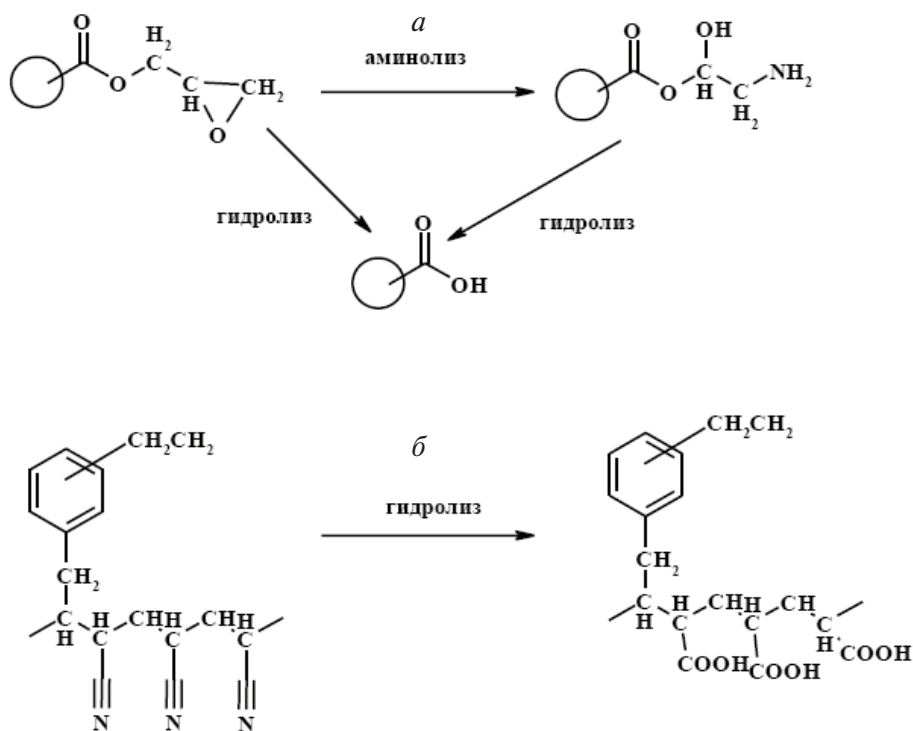


Рис. 8. Схемы щелочного гидролиза пористых сополимеров глицидилметакрилата с этиленгликоль-диметакрилатом (а) и акрилонитрила с дивинилбензолом (б)

Другой пример неионогенной матрицы — пористый сополимер дивинилбензола и полиакрилонитрила (ПАН), который в результате щелочного гидролиза в жестких условиях может быть преобразован в пористый карбоксильный катионит КМ-2 п.

Фрагменты структуры исходного сополимера $C-C\equiv N$ практически линейны, и это определяет ориентацию карбоксильных групп по отношению к основной цепи сшитой полимерной сетки. Схема гидролиза нитрильных групп сополимера представлена на рис. 7, б. Этот же сополимер при гидролизе в присутствии гидроксиламина может быть преобразован в полиамфолит АМО-Х, содержащий амидоксимные функциональные группы. Матрица ПАН — ДВБ используется также для получения микропористого угольного сорбента СКН, который находит широкое применение для неспецифической сорбции балластных веществ в биотехнологии.

Нужно отметить, что для большинства однородных по химическому составу ионообменных материалов независимо от формы (гранулы, волокна или мембраны) характерна смешанно-диффузионная кинетика сорбции, лимитирующая процесс массообмена.

Для ускорения сорбционных процессов разработаны различные варианты композиционных ионообменных материалов.

Вопросы для самопроверки

1. Назовите основные методы введения ионогенных групп при синтезе ИОС.
2. С какой целью применяют кросс-агенты?
3. От чего зависит и как влияет на свойства ионита степень набухаемости?
4. Какие мономеры используют при синтезе пористых полимерных матриц ИОС для сорбции биологически активных веществ?
5. Какие ионообменные смолы используют при выделении и очистке антибиотиков, аминокислот, белков?

5. Практика проведения процессов ионообмена

5.1. Основные режимы процессов ионообменной сорбции

Выделение, очистка и разделение веществ сорбционными методами может быть осуществлено в виде «статического» процесса, когда в системе устанавливается равновесие между растворенным веществом и взвешенным в растворе адсорбентом, и в виде динамического процесса, который осуществляется в сорбционных колонках. По динамическим характеристикам ионообменные процессы можно разделить на периодические, полунепрерывные и непрерывные.

Процессы в **статическом режиме** чаще всего проводят в аппаратах с мешалками. Ионит суспендируют в обрабатываемом растворе и оставляют на время, достаточное для установления равновесия. Раствор сливают (фильтруют), ионит подвергают десорбции. Для этого ионит заливают новым раствором с измененным рН или содержащим противоион. Противоион связывается с ионитом, а сорбированное ранее вещество переходит в жидкую фазу. В процессе сорбции-десорбции продукт освобождается от примесей, которые уходят с исходным раствором.

В биотехнологии ионообмен в статических условиях не нашел применения, что объясняется низкой степенью использования обменной емкости ионита, громоздкостью оборудования, механическими потерями, связанными с быстрым истиранием части смолы, энерго- и трудоемкостью процесса.

Наиболее часто в промышленности используют **динамический способ** ионообмена, при котором обрабатываемый раствор непрерывно пропускают через ионит в одном направлении. В динамических условиях равновесие устанавливается между сорбентом и исходным раствором, так как десорбируемые ионы постоянно выводятся из колонки. В связи с этим создаются более благоприятные условия для поглощения сорбируемых ионов и, следовательно, высокая динамическая обменная емкость.

Такой же эффект наблюдается при динамической десорбции (**элюировании, элюции**). Подвижной фазой (**элюентом**) в процессе десорбции являются чаще всего водные растворы, что объясняется высокими растворяющими и ионизирующими свойствами воды и обеспечивает быстрый обмен противоионов. В результате элюирования на выходе из ионообменника получают раствор, называемый **элюатом**.

Эффективность динамического процесса значительно превосходит эффективность разделения веществ при статическом сорбционном процессе. Поэтому динамический способ — основной способ ионообменной очистки.

Периодические и полунепрерывные процессы в динамическом режиме, как правило, осуществляют в цилиндрических колонных аппаратах — ионитовых фильтрах или ионообменных колоннах. В биотехнологических производствах применяют колонные аппараты закрытого и открытого типа с колпачковыми распределительными устройствами.

Закрытый фильтр представляет собой колонну, заполненную гранулами ИОС (рис. 9). Раствор подается под напором сверху через специальное распределительное устройство. Верхнее распределительное устройство, как правило, выполняется из полиэтилена, может быть лучевого типа, диспергатора типа душевого рожка или в виде перфорированного стакана. Рабочее давление в аппарате до 3 ат.

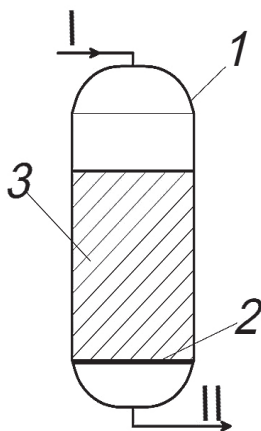


Рис. 9. Схема «закрытого» фильтра:

1 — корпус, 2 — колпачковый фильтр, 3 — слой ионита, I — исходный раствор,
II — отработанный раствор

В нижней части колонны установлен виниловый фильтр («ложное днище») с отверстиями, к которым приварены штуцеры для ввин-

чивания щелевых колпачков, удерживающих смолу. Количество отверстий определяется расчетом, исходя из необходимой скорости фильтрования (производительности) и применяемого колпачка [7].

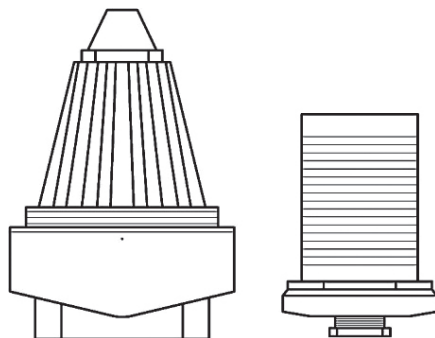


Рис. 10. Щелевые колпачки

В колпачках (рис. 10) сделаны прорезы размером 0,2–0,3 мм для прохождения жидкости. Изготавливают щелевые колпачки из пропилена, пористого полиэтилена, винипласта, капралона.

При осуществлении процесса сорбции-десорбции работа колонны протекает следующим образом. В колонну загружают ИОС в соответствующей ионной форме и непрерывно с определенной скоростью начинают подавать нативный раствор. Происходит постепенное насыщение смолы продуктом, которое может занимать длительный отрезок времени. Отработанный нативный раствор сливают в канализацию, контролируя остаточную концентрацию извлекаемого продукта, например определяют активность антибиотика. По мере насыщения ионита степень извлечения продукта из раствора уменьшается, значение остаточной активности увеличивается, и с определенного значения нативный раствор отправляют для сорбции продукта на другую колонну. Первый фильтр отключается и вторая колонна становится основной. Если второй колонны недостаточно для обеспечения полноты извлечения, то подключают третью и т. д.

После окончания процесса сорбции на отключенной колонне проводят последовательно следующие технологические операции: вытеснение нативного раствора обессоленной водой, десорбцию продукта и затем регенерацию ИОС.

Процесс элюции (десорбции) происходит до момента, когда концентрация продукта в выходном потоке достигает предельного уровня.

ня. Обычно объем элюата меньше, чем объем исходного раствора, что позволяет наряду с очисткой вещества проводить частичное концентрирование раствора.

Батарейный принцип работы ионообменных фильтров закрытого типа получил наибольшее распространение при выделении антибиотиков. Так как аппараты герметичны, то для создания продвижения жидкости в колоннах достаточно напора, создаваемого насосом, подающим нативный раствор.

Недостатком колонн закрытого типа является неподвижность слоя ионита, который сжат напором поступающей жидкости. В результате происходит слипание гранул ИОС, образование каналов и застойных зон, не участвующих в процессе ионообмена.

В открытом фильтре используют восходящий поток жидкости, скорость которого подбирается так, чтобы ионит находился в псевдооживленном состоянии. Псевдооживление устраняет уплотнение смолы с образованием местных каналов для жидкой фазы и способствует более полному использованию сорбционной емкости ионита. В верхней части колонны находится расширение, предназначенное для осаждения гранул ИОС, взвешенных в уходящем потоке жидкости (рис. 11). Вывод отработанного раствора из колонны снабжен системой улавливания ионита (за счет изменения направления потока).

Применение открытых фильтров связано с некоторым усложнением установки, так как из-за потери напора жидкости в открытой колонне подключение к первой колонне последующих (второй, третьей и т.д.) должно производиться не непосредственно, а через промежуточные сборники с нагнетательными насосами.

Периодический процесс ионообменной сорбции имеет ряд недостатков: длительность процесса, большой расход смолы, уменьшение движущей силы процесса за счет продольного перемешивания смолы, получение различных по концентрации и чистоте фракций элюата.

Особый интерес представляет такой вид динамического метода ионообмена, как **ионообменная хроматография**. Ионообменная хроматография основана на способности ионита к избирательной сорбции (десорбции) разных ионов. Благодаря этим различиям извлекаемые ионы распределяются в слое ионита соответственно степени сорбируемости. Данный способ применяется для разделения смеси компонентов и осуществляется путем последовательного элюирования каждого компонента подходящим растворителем.

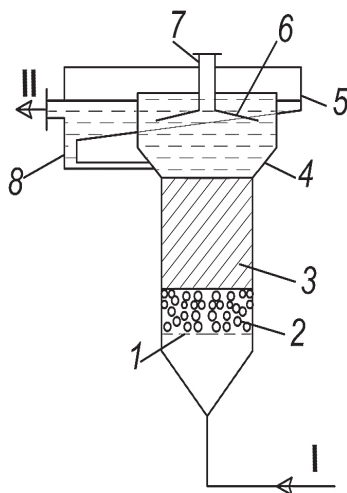


Рис. 11. Схема колонны открытого типа [7]:

- 1 — колпачковый фильтр, 2 — слой зернистого материала, 3 — слой ионита,
 4 — корпус, 5 — кольцевой карман, 6 — экран для задержания ионита,
 7 — патрубок для сообщения с атмосферой, 8 — переливной патрубок,
 I — исходный раствор, II — отработанный раствор

В результате фракционного разделения в слое сорбента выделяемый продукт оказывается сконцентрированным на определенном участке ионита, а при дальнейшей элюции происходит удаление сорбированных ионов в порядке, обратном степени прочности их связи с ионитом. Для селективного элюирования применяют воду, буферные растворы с определенной ионной силой, растворы минеральных (хлористоводородной, азотной, серной, фосфорной) и органических (лимонной, молочной, винной) кислот.

В настоящее время ионообменная хроматография применяется преимущественно как аналитический метод, а также для препаративного выделения и очистки высокополярных биологически активных веществ (антибиотиков, аминокислот, пептидов и т. п.)

5.2. Аппаратурное оформление процесса ионообмена непрерывным способом

Проведение ионообменных процессов при непрерывном противотоке взаимодействующих фаз позволяет интенсифицировать производство, снизить затраты за счет более полного использования ио-

нита и реагентов. Для непрерывных процессов сорбции применяют несколько типов ионитовых фильтров [8–10].

Аппараты с плотным *движущимся слоем ионита* представляют собой колонны, весь рабочий объем которых заполнен ионитом. Это обеспечивает большее время контакта ионита с раствором, чем в аппаратах со взвешенным слоем, и дает возможность создания высокоэффективных сорбционных аппаратов.

Наиболее распространены аппараты с противоточным движением фаз. Они подразделяются на аппараты с гравитационным и принудительным движением ионита.

Применение противотока позволяет увеличить среднюю движущую силу процесса, сократить в 2–5 раз необходимое время контакта, реализовать большое число ступеней изменения концентрации, увеличить динамическую емкость ионита и сократить его расход.

В аппаратах с гравитационным движением ионита раствор подается снизу, а ионит — сверху. Аппараты рассматриваемой конструкции так же, как и другие противоточные колонны, имеют невысокую эффективность. Их удельная производительность мала, так как скорость раствора должна быть меньше скорости псевдоожижения (т. е. приблизительно 1–5 м/ч). Кроме того, эффективность таких аппаратов сильно уменьшается при увеличении диаметра, и они непригодны для крупномасштабных процессов. Достоинство аппаратов — простота конструкции.

Для увеличения удельной производительности аппарата с принудительной подачей сорбента на слой ионита прилагают сверху дополнительное усилие, которое не дает слою расширяться. Это усилие создается с помощью напорного слоя ионита, гидротарана, механического устройства типа шнека (рис. 12) [10].

При использовании напорного слоя значительно увеличивается загрузка ионита, в то время как производительность увеличивается незначительно. Гидротаран обеспечивает бóльшую производительность.

Повышение эффективности аппаратов с принудительным движением фаз может быть достигнуто с помощью наложения пульсаций, улучшающих распределение фаз по сечению (рис. 12, б, в).

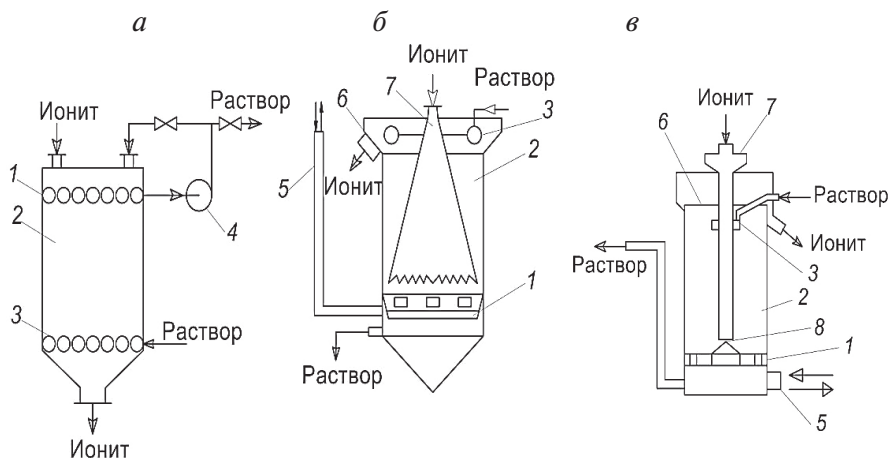


Рис. 12. Аппараты непрерывного действия с плотным слоем ионита и с противоточным движением фаз:

а — аппарат с гидротараном; *б* — колонна КНСПр; *в* — пульсационная колонна:
 1 — дренажная система; 2 — контактная камера; 3 — распределительная система;
 4 — насос; 5 — система пневматической пульсации; 6 — кольцевой порог;
 7 — напорная труба; 8 — отражатель

При этом организация принудительного движения сорбента может быть осуществлена сверху вниз (рис. 12, *б*) или наоборот (рис. 12, *в*). В последнем случае удельная производительность ограничивается скоростью свободного фильтрования, которая зависит от диаметра зерна ионита, вязкости и плотности раствора и достигает $10\text{--}15 \text{ м}^3/(\text{м}^2 \times \text{ч})$. Для передвижения сорбента устанавливается напорная труба, высота слоя ионита в которой больше, чем в аппарате. Ионит загружается в бункер, опускается по трубе и попадает в кольцевую контактную камеру, расположенную между трубой и корпусом аппарата. Затем ионит поднимается противотоком к жидкости вверх и выгружается через кольцевой порог в разгрузочную камеру. Раствор подается в контактную камеру через кольцевой перфорированный коллектор и выводится через дренажное устройство в переливное колено. Рассматриваемый аппарат прост по конструкции и имеет высокий коэффициент использования контактного объема. Однако он очень чувствителен к качеству материала и работает лишь в узком диапазоне его дисперсного состава и разности плотностей твердой и жидкой фаз.

Контактные аппараты со смешанным и прямоточным движением фаз не могут обеспечить более одной теоретической степени кон-

такта. Однако эти аппараты просты по конструкции, в эксплуатации и широко используются в промышленности. Из аппаратов этого типа наибольшее распространение получил смеситель-отстойник типа «пачук» (рис. 13) [6], который представляет собой вертикальный аппарат, снабженный двумя эрлифтами.

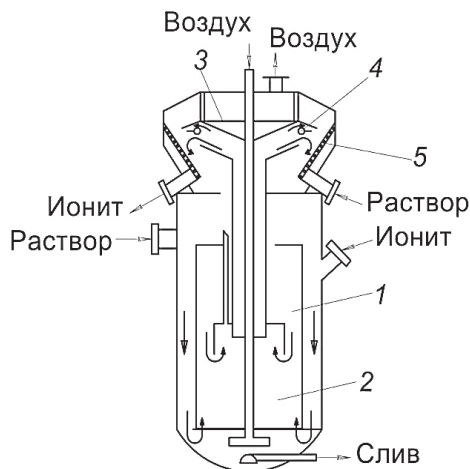


Рис. 13. Аппарат со смешанным движением фаз («пачук»):

- 1 — циркуляционный эрлифт; 2 — зона смешения ионита и раствора;
3 — отражатель; 4 — эрлифт для загрузки ионита; 5 — дренажная система

Эрлифты служат для перемешивания ионита и раствора, выгрузки ионита и откачки пульпы «ионит — раствор» на дренажное устройство, с которого ионит снова возвращается в контактную зону, а раствор выводится из аппарата. Объем «пачуков» составляет несколько десятков и сотен кубометров, время пребывания раствора в аппарате — 20–60 мин. Для достижения заданных технологических показателей обычно устанавливают каскад таких аппаратов.

Прямоточный аппарат с перемешиваемым или циркулирующим слоем ионита показан на рис. 14 [9]. На практике такие аппараты соединяют в противоточный каскад, и время пребывания в таком каскаде аппаратов может меняться от десятков минут до десятков часов. Удельная производительность аппаратов достигает $100 \text{ м}^3/(\text{м}^2 \times \text{ч})$. Для многоступенчатых установок с небольшой мощностью используют пневматические устройства, обеспечивающие периодическое псевдооживление слоя ионита.

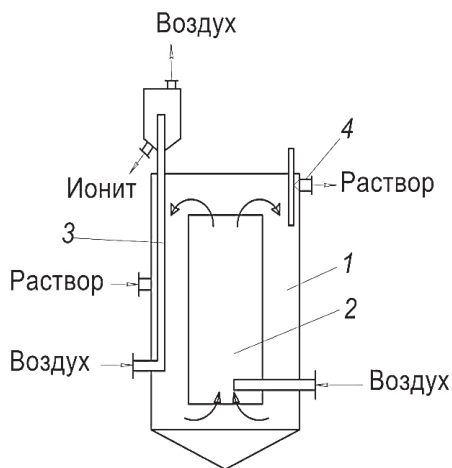


Рис. 14. Аппарат с циркулирующим слоем ионита:

1 — зона транспортировки и разделения; 2 — контактная камера;
3 — эрлифт для выгрузки ионита; 4 — дренажная система

В верхней расширяющейся части колонны ионит отделяется от раствора и под действием силы тяжести оседает в желоб и выводится из аппарата. Осветленный раствор выводится из верхней разделительной зоны через сливной желоб.

Широкое распространение получили также аппараты с противоточным движением фаз (рис. 15) [9, 10]. Эффективность противоточных колон со взвешенным слоем зависит от времени пребывания частиц ионита в аппарате, равномерности распределения фаз по сечению и их продольного перемешивания.

Наиболее равномерное распределение раствора и ионита по сечению аппарата достигается секционированием последнего тарелками. На каждой тарелке лежит слой псевдоожиженного ионита, толщина которого определяется высотой перетока (рис. 15, а) и составляет 4–8 см [10].

Тарельчатые колонны с переточными стаканами имеют большую, чем колонны типа КДС (колонны без секционирования), удельную производительность [$10\text{--}20 \text{ м}^3/(\text{м}^2 \times \text{ч})$].

Гидравлическое сопротивление тарельчатых колонн с переточными стаканами невелико. Однако эксплуатация этих колонн затруднительна из-за сложности вывода их на рабочий режим ввиду неустойчивости работы перетоков.

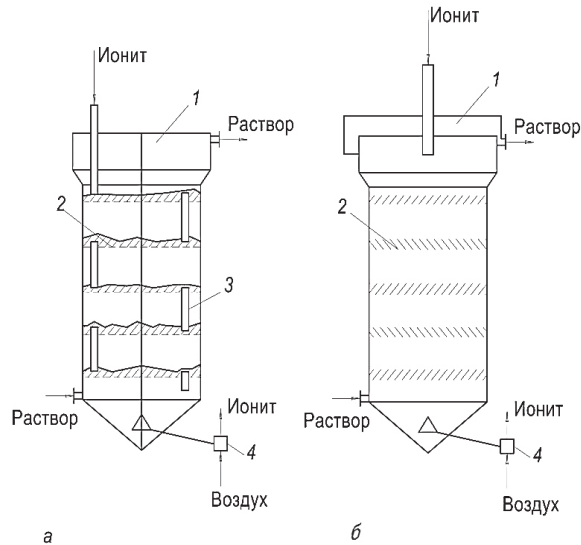


Рис. 15. Аппараты со взвешенным слоем ионита при противоточном движении фаз:

а — тарельчатая колонна с переточными стаканами; *б* — колонна с провальными тарелками: 1 — верхняя разделительная зона; 2 — тарелка; 3 — переточное устройство; 4 — эрлифт

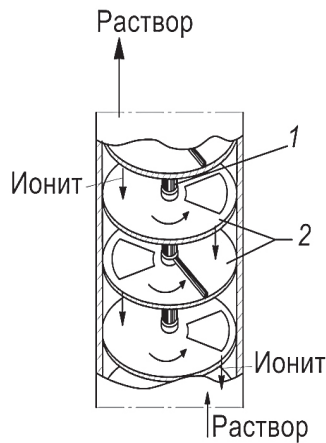


Рис. 16. Колонна с провальными тарелками:

1 — ось; 2 — вращающиеся тарелки с отверстиями

Для упрощения конструкции колонн и ликвидации трудностей, связанных с использованием переточных устройств, применяются про-

вальные тарелки с большим живым сечением. Колонны с провальными тарелками (рис. 15, б, рис. 16) [8, 10] можно эксплуатировать как в режиме свободно падающего ионита, так и в режиме обычного псевдоожиженного слоя.

Широкое распространение получили пульсационные колонны ПСК диаметром до 2,4 м и производительностью 200 м³/ч. В противоточных колоннах ПСК с распределительной пульсацией используют режим свободного и стесненного движения твердой фазы.

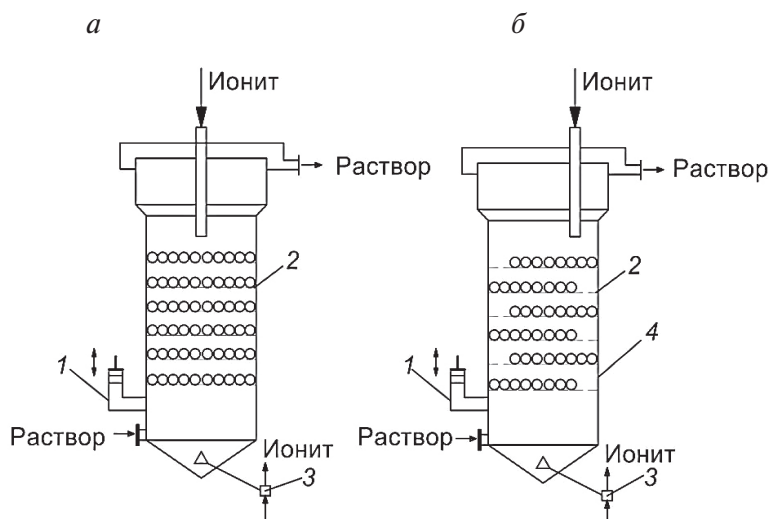


Рис. 17. Аппараты с распределительной пульсацией:

а — с транспортной пульсацией; б — с шариками на тарелках;
 1 — пульсационное устройство; 2 — тарелка; 3 — эрлифт; 4 — переточное устройство

В колоннах типа ПСК-Т (рис. 17, а) [10] пульсация применяется для транспортировки фаз и регулирования времени их контакта.

Колонна имеет распределительные тарелки типа КРИМЗ, которые задерживают ионит при движении раствора вверх, но пропускают сорбент вниз при изменении направления подачи раствора на нисходящее (рис. 18).

При каждой подаче импульса происходит перенос ионита с одной тарелки на другую. Изменяя частоту и амплитуду импульсов, регулируют время пребывания частиц в контактной зоне и объемный поток. Время пребывания может колебаться от 10–20 мин до 10 ч на 1 м вы-

соты при удельной нагрузке по раствору 30–40 м³/(м²×ч). Максимальная производительность колонн этого типа — 150 м³/(м²×ч).

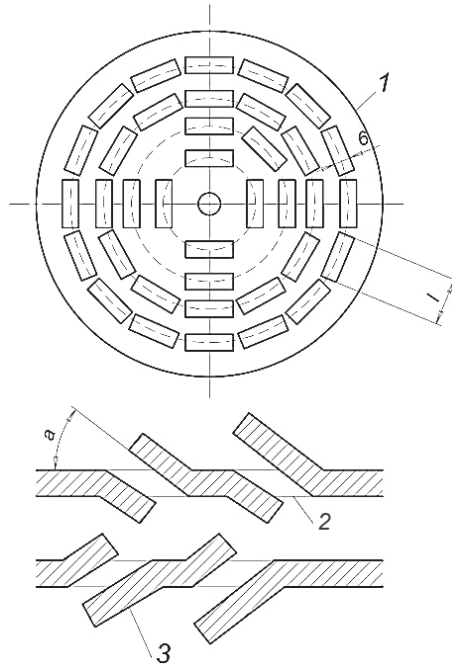


Рис. 18. Конструкционная схема тарелки КРИМЗ:

1 — тарелка; 2 — отверстие; 3 — направляющие лопатки

На основании анализа различных конструкций ионообменных аппаратов можно выделить следующие основные тенденции их развития:

- разделение контактной зоны на секции с целью снижения продольного перемешивания фаз;
- применение эффективных методов разделения фаз при переходе из одной секции в другую;
- организация развитого гидродинамического режима с целью равномерного распределения фаз, устранения застойных зон и других видов локальной неравномерности процесса;
- реализация по возможности плотного противоточного движения ионита и в связи с этим развитие секционных и камерных аппаратов с плотным слоем ионита на тарелках.

В известных схемах непрерывного ионообменного выделения и очистки веществ отдельные стадии (сорбцию, десорбцию, регене-

рацию и др.) проводят или в одном аппарате, или чаще в батарее однотипных аппаратов. Существуют установки, состоящие из колонн различной конструкции, объединенных системой транспорта ионита. В этой системе используются эрлифты, электоры или прерывистая передача за счет разницы давления.

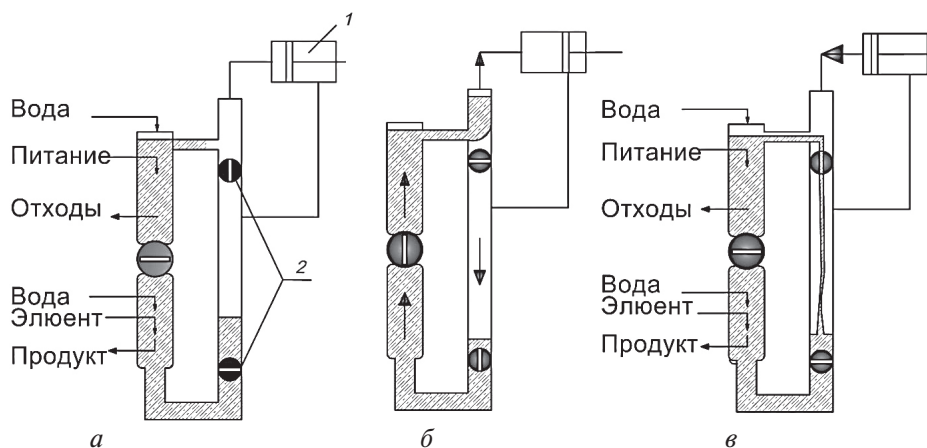


Рис. 19. Схема установки Хиггинса [8]:

а, в — период накачивания раствора; *б* — период движения смолы:
1 — поршневой насос; 2 — клапаны [8]

Самыми распространенными схемами непрерывного ионообмена являются установки Хиггинса и «Асахи», в которых используется движущий слой сорбента.

В установке Хиггинса (рис. 19) происходит поочередное движение ионита и раствора под действием поршневого насоса и клапанов [8]. Раствор подается сверху вниз, а движение ионита осуществляется снизу вверх за счет гидравлического удара по основанию слоя ионита. При движении ионита подача раствора прекращается, и в течение нескольких минут через неподвижный слой ионита движется раствор. Схема состоит из четырех образующих петлю секций. К недостаткам установки Хиггинса можно отнести наличие клапанов, большие нагрузки на сорбент, вызывающие быстрое истирание смолы и разрушение зерен, невозможность использования загрязненных растворов.

Установка «Асахи» включает три колонны: сравнительно короткий адсорбер, узкую и высокую колонну регенерации и колонну промывки (рис. 20) [8].

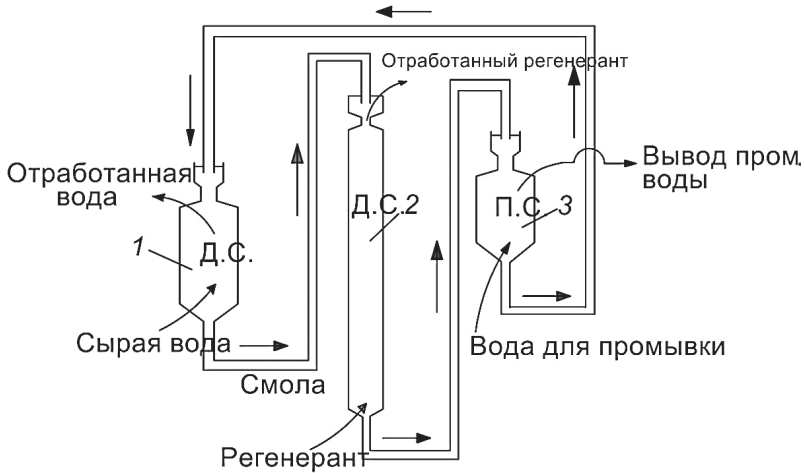


Рис. 20. Схема установки непрерывного действия «Асахи» [8]:

1 — колонна адсорбции; 2 — регенерирующая колонна; 3 — колонна промывки;
 ДС — движущийся слой ионита; ПС — псевдоожиженный слой ионита

Первые две колонны используют движущий слой, третья — псевдоожиженный. В установке используются шаровые клапаны, что значительно уменьшает механическое воздействие на ионит.

Анализ аппаратуры для проведения ионного обмена показывает существенное преимущество непрерывных процессов, противоточных многосекционных аппаратов с псевдоожижением и установок с движущимся слоем. В каждом конкретном случае использования ионообмена необходим индивидуальный подход к выбору аппаратного оформления процесса.

Вопросы для самопроверки

1. Охарактеризуйте основные режимы и способы проведения процессов ионного обмена.
2. В чем отличие ионообменных колонн открытого и закрытого типа?
3. В чем преимущество сорбции с псевдоожиженным слоем ионита?
4. Какие конструкции аппаратов применяются при непрерывном процессе ионообмена?
5. В чем преимущество использования ионитовых колонн с пульсационными устройствами?

.....

6. Применение сорбционных методов для выделения и очистки продуктов биосинтеза

.....

6.1. Применение молекулярной сорбции

.....

Процесс молекулярной сорбции отличается от ионообмена только природой сорбента, в качестве которого выступают вещества без функциональных групп или микропористые адсорбционные смолы. На твердом сорбенте происходит сорбция целых молекул, как правило, неполярных веществ.

Самым распространенным и первым природным сорбентом является активированный уголь, который используется в процессах очистки антибиотиков. В первых исследованиях по выделению и очистке антибиотиков-аминогликозидов именно уголь использовали в качестве сорбента.

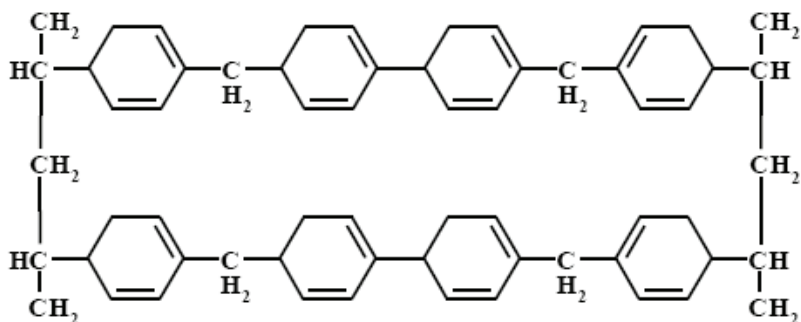
Низкая селективность угля как адсорбента (одинаково хорошо сорбирует и выделяемое вещество, и целый ряд других примесей) не позволяет использовать его для одностадийного процесса выделения. В настоящее время активированный уголь применяют только в процессах осветления для удаления окрашенных пигментов из растворов антибиотиков.

Вторым по значению молекулярным адсорбентом является окись алюминия, которая обладает и свойствами ионита. Так как специфичность окиси алюминия также мала, она находит применение для выделения и очистки продуктов биосинтеза только в тех случаях, когда возможно многократное повторение процессов сорбции-десорбции.

В настоящее время получены синтетические полимерные сорбенты (на основе стирола, акриловых эфиров), обладающие преимуществами по сравнению с углем: большей внутренней поверхностью, большим диаметром пор.

Макропористый неионогенный сорбент Амберлайт ХАД-4, представляющий собой сополимер стирола с дивинилбензолом, связывает низкомолекулярные соединения. Амберлайт ХАД-4 применяют для сорбции солей органических кислот, в частности аминокислот.

Неионогенный сорбент Стиросорб МХ-100 получен сшиванием полистирольных цепей монохлордиэтиловым эфиром, имеет 100 % сшивки и относится к типу сверхсшитых сорбентов. Такие полимеры получают не традиционными методами сополимеризации мономеров, а сшиванием цепей полистирола, находящихся в растворе или в набухшем состоянии, бифункциональными соединениями, образующими в конечной сетке мостики жесткой структуры [11]:



В сверхсшитых полимерах содержание сшивающих мостиков составляет более 40 % сетки. Сверхсшитые сорбенты отличаются высокими кинетическими характеристиками, легкостью регенерации, находят применение для выделения биологически активных веществ. Например, показана возможность использования Стиросорба МХ-100 для очистки фосфолипидов [12].

Иммобилизация глюкоамилазы на Стиросорбе МХ-100 позволила получить фермент с высокой активностью (67–86 % от активности свободного фермента). Вследствие макросетчатой структуры полимерного каркаса сорбента иммобилизованные молекулы фермента хорошо доступны для молекул субстрата. Препараты иммобилизованной глюкоамилазы более термостабильны, чем нативный фермент, и могут быть неоднократно использованы в циклах расщепления углеводов [13].

6.2. Применение ионного обмена для выделения и очистки биологически активных веществ

Ионнообменная сорбция в производстве антибиотиков

К технологическим процессам, используемым при выделении и химической очистке антибиотиков, предъявляются особые требования, свя-

занные со специфическими свойствами целевых продуктов. В первую очередь это касается химических и термических условий их проведения.

Применение ионообменных технологий позволяет проводить процесс химочистки антибиотиков в достаточно мягких условиях при невысоких температурах. Каталитические функции ионитов могут быть подавлены изменением ионной формы сорбента или заменой сильного ионита на средний или слабый по силе. Причем этот метод химической очистки наиболее прост в аппаратурном оформлении, дешев, экологичен.

Так как многие антибиотики неустойчивы в кислых или щелочных растворах, то для их выделения используются чаще всего иониты со слабоионизированными группами, в частности карбоксильные катиониты.

Перед проведением ионообменной сорбции нативный раствор антибиотика должен быть максимально освобожден от конкурирующих ионов. В случае сорбции на катионитах — от ионов кальция, магния, железа.

Теоретически методом ионного обмена можно выделить из нативного раствора и очистить все антибиотики, поскольку в структуре антибиотиков имеются функциональные группы либо кислого, либо основного характера.

Однако в настоящее время ионообмен используется преимущественно в производстве высокоосновных антибиотиков-аминогликозидов (стрептомицина, канамицина, гентамицина, тобрамицина) и полипептидов (бацитрацина, полимиксина).

Аминогликозиды выделяют из сложных многокомпонентных растворов, полученных в результате микробиологического синтеза. В культуральной жидкости они находятся обычно в виде изомеров и стереоизомеров.

Крупные размеры органических ионов, полиосновность молекул аминогликозидных антибиотиков (рис. 21), чрезвычайно низкая их концентрация в культуральной жидкости (не более 1 %), а также большое количество примесей, близких по своему составу к выделяемому веществу, требуют особых подходов к разработке технологии выделения и очистки данных антибиотиков.

Высокая гидрофильность аминогликозидов и, как следствие, отсутствие растворимости в неполярных растворителях не позволяют использовать для их выделения экстракционные методы. В то же время наличие большого числа аминогрупп придает им свойства сильных многовалентных оснований, что дает возможность для выделения ами-

ногликозидов сорбцией на ионообменных смолах. Благодаря высокой гидролитической устойчивости антибиотиков данного ряда в слабокислых, нейтральных и щелочных растворах, создаются возможности широкого варьирования условий выделения и очистки аминогликозидов.

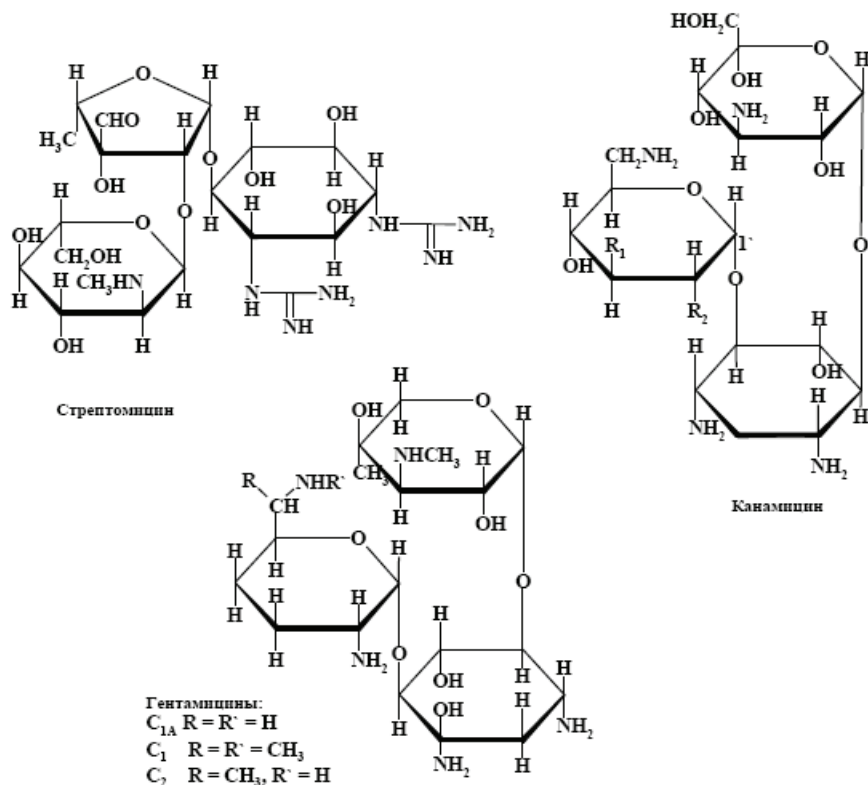
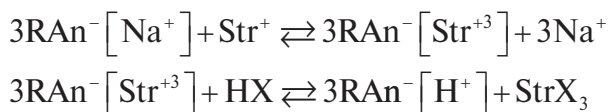


Рис. 21. Структура антибиотиков-аминогликозидов

Технологический процесс выделения аминогликозидных антибиотиков включает в себя, как правило, во-первых, отделение мицелля с помощью различного фильтрационного оборудования и, во-вторых, извлечение (сорбцию) антибиотика из раствора с последующей его химической очисткой различными способами.

Процесс сорбции-десорбции впервые был разработан для **стрептомицина**. Стрептомицин как трехзарядный катион сорбируется на карбоксильных катионитах в солевой (чаще всего натриевой) форме из нейтральных растворов с последующей десорбцией растворами кислот:



Обычно сорбцию аминогликозидов из нативного раствора проводят в режиме полного насыщения сорбента антибиотиком. В качестве сорбента чаще всего используют карбоксильные катиониты типа Амберлита JPC-50 или КБ-2 (в натриевой или аммиачной форме).

Этот метод позволяет получать концентрированные по антибиотику элюаты, содержащие незначительное количество минеральных примесей и органических пигментов. В случае использования достаточно активной культуральной жидкости (например, активность КЖ канамицина — $4000\text{--}5000 \text{ мкг}\cdot\text{см}^{-3}$) равновесное состояние насыщения сорбента активным веществом наступает за небольшой промежуток времени. При использовании же низкоактивной культуральной жидкости (например, активность КЖ гентамицина — $1000 \text{ мкг}\cdot\text{см}^{-3}$) равновесное состояние наступает гораздо медленнее и для достижения его необходимы большие объемы нативного раствора. Для сокращения времени сорбции в этом случае рекомендуется использовать избыток сорбента.

Десорбцию аминогликозидных антибиотиков проводят водными растворами минеральных кислот (серная, соляная) или водными растворами аммиака. Использование в качестве элюента растворов минеральных кислот применимо только в случае полного насыщения сорбента. Кислотная элюция в случае неполного насыщения приводит к получению слишком разбавленных элюатов с достаточно большим содержанием минеральных примесей. Кроме того, кислотная элюция обуславливает необходимость проведения регенерации сорбента после каждого его использования.

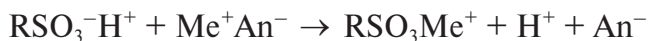
Аммиачная элюция аминогликозидов, в отличие от кислотной, применима и в случае полного насыщения сорбента активными веществами, и в случае его неполного насыщения. Поскольку водные растворы аммиака лишь в малой степени вытесняют щелочные и щелочноземельные металлы из сорбента, то этим объясняется незначительное загрязнение полученных элюатов минеральными примесями. К достоинствам аммиачной элюции можно также отнести и использование сорбента в течение достаточно длительного времени без его регенерации, что значительно снижает количество реагентов, необходимых для процесса регенерации.

Недостатком аммиачной элюции аминогликозидов является получение слишком разбавленных растворов антибиотиков, что обуславли-

вает необходимость проведения их последующего концентрирования. Концентрирование проводится также с целью удаления присутствующих в элюатах ионов аммония, препятствующих в дальнейшем переводе антибиотиков в солевую форму.

Процесс дальнейшего осветления растворов антибиотиков с использованием анионитов более продолжителен по времени. Осветленные элюаты получают сильно разбавленными и также требуют концентрирования.

Для **деминерализации** (обеззоливания) элюатов аминогликозидных антибиотиков, не удовлетворяющих требованиям по показателю зольности, применяются сульфокатиониты типа КУ-2–8, КУ-2–20, СБС, избирательно сорбирующие на себя многие минеральные примеси. Эти сорбенты отличаются большим количеством сшивающего агента и малой набухаемостью, поэтому доступ достаточно большой по размерам молекулы антибиотика к ионогенным центрам сорбента затруднен. Напротив, ионы металлов (натрия, магния, кальция) легко проникают к ионогенным группам и связываются с катионитом, обмениваясь с водородом:

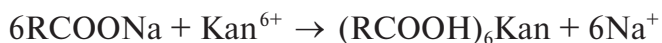


Дальнейшую **нейтрализацию** растворов проводят на различных анионитах в OH^- форме:

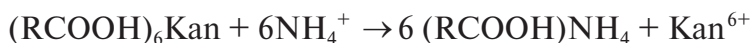


Возможно оформление процесса деминерализации и нейтрализации как одностадийного с применением катионита и анионита в одной колонне.

Технологическая схема **химочистки канамицина** приведена на рис. 22 [14]. Нативный раствор канамицина в виде шестивалентного катиона (pH 6,8–7,2) поступает на ионообменную колонну, где сорбируется на катионите КБ-2 в натриевой форме:



Нативный раствор канамицина проходит батарею (5–20) последовательно соединенных колонн. Сорбция протекает во взвешенном слое сорбента. Сорбцию ведут до тех пор, пока в исходном растворе концентрация антибиотика не составит 5–6 % от исходной. После полного насыщения каждую колонну отключают, промывают обессоленной водой и проводят десорбцию антибиотика 1N раствором аммиака или элюатом третьей фракции, укрепленным 25 %-м раствором аммиака. Процесс проходит в соответствии с уравнением



При этом образуются три фракции, из которых первая содержит незначительное количество антибиотика и отправляется на очистку стоков, вторую (основную) фракцию собирают в сборник, и третью, обедненную, используют на стадии десорбции.

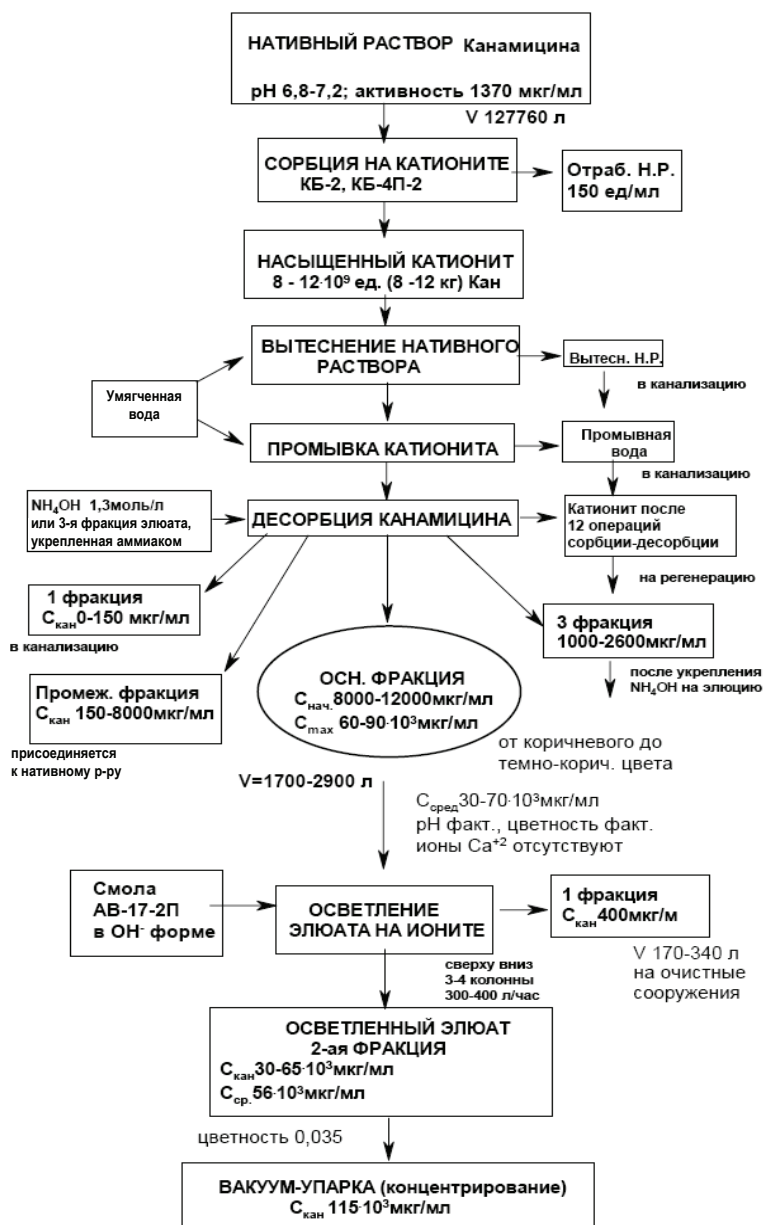


Рис. 22. Технологическая схема химочистки канамицина

После трехкратного использования сорбент КБ-2 подвергают регенерации промывками 1N растворами HCl, NaOH, обессоленной водой. Далее основная фракция канамицина поступает на колонну с анионитом АН-17—2 П в OH^- форме. Анионит избирательно поглощает пигментные примеси, не связывая антибиотик. Раствор канамицина подается сверху и проходит две последовательно соединенные колонны. Осветленный раствор собирают и отправляют на упаривание. Ионит в колонне регенерируют.

Как уже было отмечено, использование ионообменных фильтров обычного типа при выделении аминогликозидов требует большого количества колонн, занимающих значительные рабочие площади, что усложняет эксплуатацию и удорожает производство. Эти недостатки можно устранить при использовании *пульсационной колонны*. Аппаратурно-технологическая схема установки представлена на рис. 23 [15].

Основным элементом установки является сорбционно-промывной аппарат 3 — пульсационная колонна с насадками КРИЗМ. Сорбционно-промывной аппарат снабжен специальными насадками — стержнем, на котором находятся на равном расстоянии друг от друга металлические диски или тарелки со специальными отверстиями, обладающие наклонными лопатками. Такое расположение насадок при потоке жидкости создает турбулентное перемешивание потока, что обеспечивает поперечное перемешивание в аппарате.

Продольное перемешивание в аппарате осуществляется сжатым воздухом, который импульсами через специальный мембранный автопульсатор 5 подается через пульсационную камеру 4 в аппарат 3.

Конструкция сорбционно-пульсационной колонны такова, что обеспечивает максимально благоприятные условия для массообмена, так как существует и продольное, и поперечное перемешивание: сорбент находится в «кипящем» слое. В верхней части колонны установлен расширитель для снижения продольного и поперечного перемешивания раствора, и тем самым предотвращается унос смолы отработанным раствором. Для предотвращения попадания смолы в пульсационную камеру 4 и в слив в нижней части колонны установлена сетка с диаметром отверстий 0,25 мм.

Накопление сорбента и десорбцию проводят в колонне элюции 1. Передачу сорбента из сорбционно-промывного аппарата 3 в колонну элюции 1 осуществляют с помощью аэрлифтного устройства 2. Таким же аэрлифтным устройством снабжена и элюционная колонна для

возвращения сорбента после десорбции и регенерации в сорбционно-промывной аппарат 3. Аэрлифтное устройство представляет собой полую металлическую трубу, соединенную с нижней частью аппаратов. При подаче воздуха в трубу за счет изменения плотностей жидкости в трубе и аппарате сорбент транспортируется по трубе вверх. Установка включает также приемную емкость 7 для сбора, хранения и предварительной обработки раствора. Емкость снабжена центробежным погруженным насосом 8.

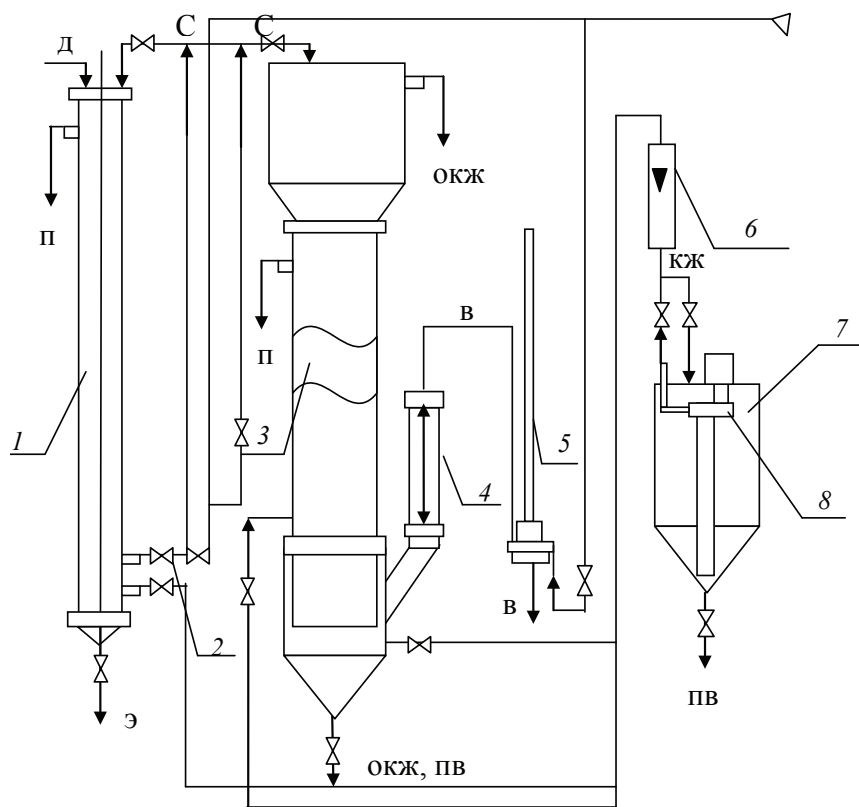


Рис. 23. Аппаратурно-технологическая схема установки бесфильтрационной сорбции:

- 1 — колонна элюции; 2 — эрлифт; 3 — сорбционно-промывной аппарат;
 4 — пульсационная камера; 5 — мембранный пульсатор; 6 — ротаметр;
 7 — приемная емкость; 8 — насос; В — сжатый воздух; Д — элюент;
 КЖ — культуральная жидкость; ОКЖ — отработанная культуральная жидкость;
 П — отбор проб; ПВ — промывные воды; С — сорбент; Э — элюат

Преимуществом псевдооживления для ионообменной сорбции аминокликозидов является повышенная скорость подачи раствора при относительно низком гидравлическом сопротивлении слоя ионита; в результате лучшего контакта раствора с ионитом насыщение последнего антибиотиком происходит быстрее, чем в неподвижном слое. Наиболее полно потенциальные преимущества псевдооживленного слоя ионита реализуются в сорбционно-пульсационных колоннах с насадками КРИЗМ благодаря уменьшению продольного перемешивания взаимодействующих фаз и, соответственно, росту движущей силы процесса.

Главным преимуществом использования псевдооживления и пульсации является возможность использования метода ионообменной сорбции из нефильтрованных культуральных жидкостей или грубо фильтрованных нативных растворов. В результате сокращается длительность процесса, повышается выход за счет снижения потерь при фильтрации, сокращаются производственные площади (за счет ликвидации фильтрационного оборудования), значительно облегчаются условия труда.

Возможность сорбции из нефильтованной культуральной жидкости была установлена для канамицина, гентамицина, стрептомицина и применяется в производстве антибиотиков.

Для выделения антибиотиков *группы тетрациклинов* (рис. 24) проводят предварительную обработку культуральной жидкости щавелевой кислотой (рН 3,0). Образовавшийся оксалат кальция выпадает в осадок, а тетрациклин образует щавелевокислую соль, растворимую в воде. Затем к культуральной жидкости добавляют соляную кислоту до рН 2,0 и желтую кровяную соль для удаления ионов Fe^{+2} . После фильтрации проводят сорбцию нативного раствора на сульфокатионитах (СБС-3 или СДВ-3) последовательно на нескольких колоннах. Десорбция 2 Н раствором аммиака дает элюаты с концентрацией ~ 3000 ЕД/мл, из которых антибиотик легко выделить осаждением [2, 16].

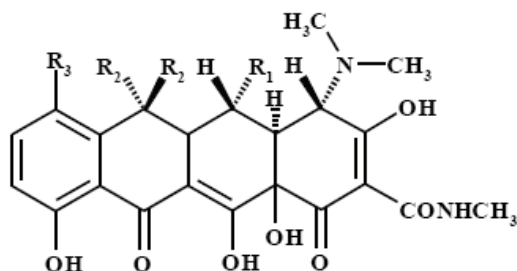


Рис. 24. Общая формула антибиотиков группы тетрациклина

Хорошие результаты были получены также при следующем способе очистки тетрациклина. От подкисленной до pH 1–5 культуральной жидкости фильтрацией отделяли биомассу, и полученный нативный раствор пропускали через систему колонок: первую, заполненную слабоосновным анионитом Амберлайт А-21, вторую и третью — заполненную макропористым Амберлайт XAD-4. Десорбцию антибиотика осуществляют 30 %-ным водным раствором ацетона, подкисленным соляной кислотой до pH 1,5.

Ионообменную сорбцию использовали для разработки технологии выделения **эритромицина** (рис. 25). Возможность сорбции на катионообменных смолах основывается на основных свойствах антибиотика, которые обусловлены третичной аминогруппой дезоамина.

Оказалось, что для сорбционного выделения эритромицина необходимо предварительно пропустить нативный раствор через плотно сшитые катиониты и аниониты для предварительной деминерализации нативного раствора или подбирать катионит, избирательно связывающий антибиотик, так как присутствие в растворе ионов Na^+ даже в количестве 0,1 мг-экв/мл раствора полностью исключает сорбцию эритромицина [17, 18].

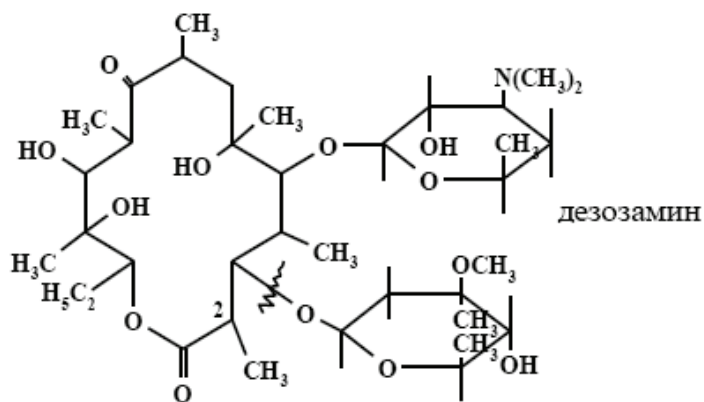


Рис. 25. Структура эритромицина

Исследования показали, что наибольшей избирательностью при сорбции эритромицина обладают поликонденсационные карбоксильные иониты типа КФУК — продукты совместной конденсации феноксиуксусной кислоты, *n*-хлорфенола и формальдегида. Десорбцию антибиотика проводят водным или спиртовым раствором минеральных

солей: сульфатом натрия, бикарбонатом аммония или смесью гидро- и дигидрофосфата натрия при pH 8.

Сорбционные методы выделения могут быть использованы для выделения β -лактамных антибиотиков. Для **цефалоспоринов** хорошие результаты были получены при сорбции антибиотика на сильноосновных анионитах типа Дауэкс-1+2 в хлоридной форме. Очистку от низкомолекулярных примесей проводят молекулярной сорбцией на неионогенном сорбенте Амберлайт XAD-4 [19].

Пенициллины как сильные кислоты могут сорбироваться на анионитах различной основности (ЭДЭ-10, Амберлайт IRA-401, Дауэкс-1 и др). К сожалению, было показано, что при применении процесса сорбции-десорбции пенициллинов на анионитах с использованием реальных промышленных растворов (фильтратов культуральной жидкости) не удается достигнуть желаемой степени десорбции и очистки элюатов от балластных соединений [20, 21].

Ионообменная сорбция в процессах выделения аминокислот, пептидов и белков

Ионообменная сорбция широко применяется при выделении аминокислот и белков, так как позволяет получить высокую степень очистки соединений.

Сорбция белков на ионообменниках определяется в основном электростатическим взаимодействием, что объясняется особенностями химического строения молекул аминокислот и белков. Аминокислоты являются цвиттер-ионами, несущими два заряда — положительный и отрицательный. Белковая молекула амфотерна, ее суммарный заряд определяется аминокислотным составом пептидной цепи (положительный заряд за счет остатков Lys, His, Arg, а отрицательный — за счет остатков Asp и Glu).

Амфотерность белка предоставляет возможность связывания как на катионитах, так и на анионитах. Для успешного проведения ионообмена раствор должен иметь значение pH, которое способствует максимальной ионизации молекулы белка и, следовательно, максимальному взаимодействию с ионогенными группами сорбента.

При значениях pH буфера ниже изоэлектрической точки белок имеет положительный заряд и будет сорбироваться на катионите. Большинство белков представляют собой слабокислые электролиты, которые в нейтральных средах ведут себя как анионы, поэтому для сорбции белков преимущественно выбирают анионообмен, что также опреде-

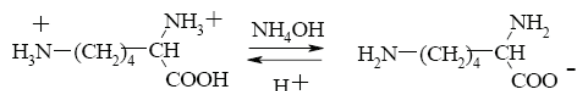
ляется следующими факторами: нейтральные среды являются областью наибольшей стабильности белка и максимальной адсорбционной емкостью анионита.

При процессе десорбции рН элюента теоретически должен быть выше изоэлектрической точки белка, но так как величины изоэлектрических точек белков, как правило, неизвестны, то выбор условий ионообмена проводят эмпирически.

Размер молекулы белка предъявляет особые требования к сорбентам. Для того, чтобы белок мог проникнуть «внутрь» ионообменной смолы и связаться с ионогенными центрами необходимы сорбенты «рыхлой» структуры. Сорбенты на основе полистирольной матрицы не отвечают этим требованиям, поэтому для выделения белков чаще используют ионообменники на основе целлюлозы, агарозы, декстрана.

Как пример применения ионообмена для получения аминокислот можно привести сорбционный способ выделения *лизина*. Культуральную жидкость после стадии ферментации без предварительного фракционирования и очистки пропускают через катионит КУ-2-8 в аммонийной форме при рН 1,5–1,9.

Двухзарядный катион лизина в выбранных условиях селективно сорбируется на катионообменнике (без отделения от биомассы), при этом ионы кальция, калия, натрия, аммония вытесняются лизином в равновесный раствор, а ионит насыщается аминокислотой.



Элюирование лизина проводится 4,5 %-м раствором аммиака. В этих условиях происходит перезарядка лизина и переход его в анионную форму, что приводит к быстрому вытеснению аминокислоты из сорбента.

Лизин в процессе сорбции-десорбции эффективно отделяется от сопутствующих аминокислот. Таким образом, можно получать субстанцию аминокислоты медицинского назначения.

Ионообмен — один из методов очистки *глутаминовой кислоты*, полученной микробиологическим синтезом. Типовая методика включает следующие операции: водный раствор технической кислоты пропускают через колонки с КУ-2, при этом глутаминовая кислота достаточно прочно сорбируется на смоле. Смолу тщательно промывают водой и буферными растворами для удаления водорастворимых примесей

и минеральных солей. Последующую десорбцию кислоты осуществляют 0,5–1 % раствором аммиака. Последующие стадии включают концентрирование элюата и перекристаллизацию полученного осадка кислоты. Таким образом, получают субстанцию глутаминовой кислоты фармакопейной чистоты.

Сорбционные методы используются для выделения антибиотика полипептидной природы — **полимиксина**, содержащего в цепи шесть остатков 2,4-диаминобутановой кислоты (рис. 26) [22]. Так, описана технология очистки полимиксина с помощью адсорбции, например, на катионите СБС-1 с последующей нейтрализацией на анионите ЭДЭ-10.

Разработан метод выделения полимиксина из нативного раствора с помощью неионогенных адсорбентов полистирольного типа с определенными поверхностными параметрами. Хорошие результаты были получены при использовании полистирольного сорбента Дауэкс, имеющего достаточно большую сорбционную емкость и используемого для сорбции веществ с большим молекулярным весом. Этот материал позволяет проводить количественную десорбцию полимиксинов небольшими объемами растворителя и таким образом получать концентрированные растворы. Большая часть сопутствующих примесей остается на сорбенте. На конечной стадии выделения полимиксина для освобождения от примесей неорганического характера применяли сульфокислотные катиониты КУ-2–8ЧС, КУ-2–20, что позволило получить субстанцию фармацевтической чистоты.

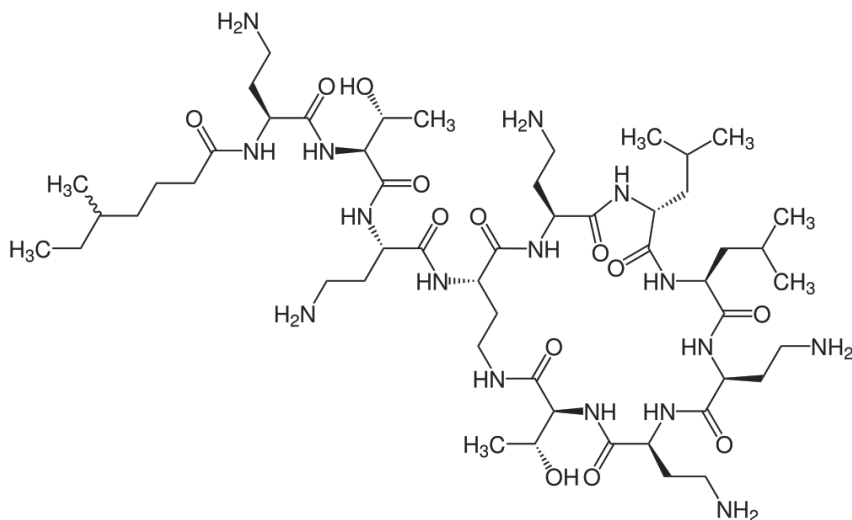


Рис. 26. Структура полимиксина Е

Ионообменный метод эффективно применяется для отделения **ферментов** от сопутствующих примесей. Выделение ферментов проводят иногда непосредственно из экстракта, предварительно добавляя в него реагенты (буферные системы) для создания оптимального значения pH, при котором можно провести избирательную сорбцию фермента. Как при сорбции, так и при десорбции фермента со смолы необходимо подбирать составы экстрагента и элюента и определять значения pH. Необходимо учитывать возможность инактивации фермента в определенных системах электролитов.

Наряду с ионообменом для очистки ферментов используются молекулярная адсорбция, гель-фильтрация и средство к иммобилизованному на носителе лигандам — аффинная хроматография. Технология выделения может быть оформлена и как колоночная хроматография, и как адсорбция в объеме.

В качестве ионитов при сорбции белков используют специально обработанный порошок целлюлозы, модифицированной заряженными группами. Такая модификация увеличивает и стабилизирует пористость структуры за счет взаимного отталкивания зарядов. Как основу для адсорбентов используют и другие биополимеры — декстраны и агарозы. В качестве катионитов обычно используют карбоксиметил- или сульфопропилпроизводные, а к анионитам относятся ДЭАЭ- (диэтиламиноэтил-), ТЭАЭ- (триэтиламиноэтил-), ЧАЭ- (четвертичный аминоэтил-) производные.

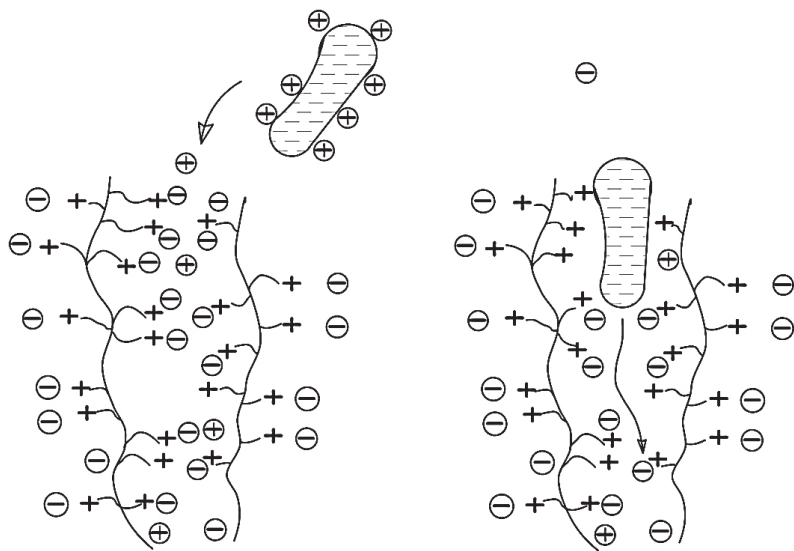


Рис. 27. Схема ионного обмена белка [23]

Белок, как и противоионы, нейтрализует адсорбент, и в месте нахождения белка образуются нейтральные зоны. На схеме (рис. 27) показано, как семь положительно заряженных ионов, ассоциированных с белком, вытесняются вместе с семью отрицательными противоионами [23].

После адсорбции целевого белка на сорбенте проводят его десорбцию, изменяя рН буфера, как было сказано выше, до значения, когда связь адсорбента с белком ослабевает, или методом аффинной элюции.

Для десорбции первым методом используют растворы хлоридов натрия или калия. В присутствии ионов соли притяжение между белком и сорбентом уменьшается в значительной степени и начинается процесс элюции, белок продвигается в нижнюю зону колонки [23]. Высокие концентрации соли и более быстрое продвижение по колонке приводят к сужению зон расположения белков и обеспечивают хорошее фракционирование при выходе с сорбента.

Аффинная элюция белка проводится с помощью введения специального лиганда, который селективно связывается с адсорбированным белком, и далее комплекс «белок — лиганд» удаляется из колонки.

6.3. Применение аффинной хроматографии

Метод основан на способности белков, прежде всего ферментов, избирательно взаимодействовать с лигандами (аффинатами), ковалентно связанными с инертным носителем (рис. 28).

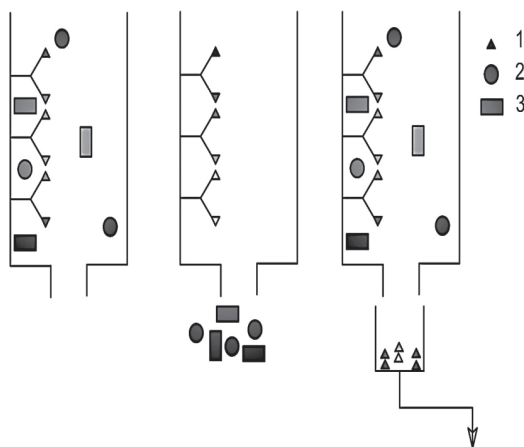


Рис. 28. Принцип разделения пробы в аффинной хроматографии [24]:

1 — лиганды; 2, 3 — молекулы разделяемых белков

При разделении ферментов лигандами служат их субстраты, коферменты, конкурентные ингибиторы, то есть взаимодействие основано на биологической функции ферментов. Такое связывание весьма специфично, что и позволяет выделить тот или иной фермент из множества других белков.

Неподвижная фаза в аффинной хроматографии представляет собой специально полученный сорбент, построенный, как показано на рисунке: носитель — соединяющее звено («ножка») — лиганд (рис. 29).



Рис. 29. Схема прикрепления белка с гистидиновым фрагментом к грануле в аффинной колонке [24]

В качестве носителя для иммобилизации лигандов используют агарозу и ее производные с сетчатым строением.

Агароза — линейный гетерополисахарид, построенный из чередующихся остатков D-галактозы и 3,6-ангидро-L-галактозы (рис. 30). По своим свойствам агароза удовлетворяет почти всем требованиям, предъявляемым к носителям для аффинной хроматографии.

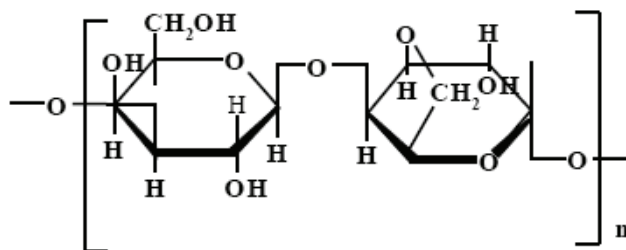


Рис. 30. Агароза (фрагмент)

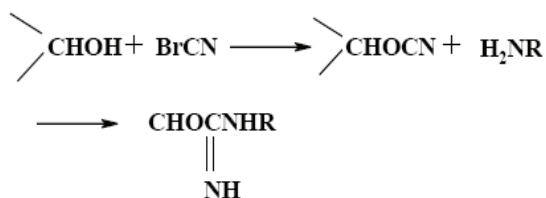
В качестве сорбентов для аффинной хроматографии применяются следующие гели на основе агарозы: сефароза 4В, сефароза CL, аффи-гель. Сефарозы, гели агарозы со сферическими частицами продаются в набухом состоянии (в виде суспензий) и содержат 0,02 % азида натрия, обеспечивающего бактериостатичность.

Сефароза 4В содержит 4 % агарозы. Внутреннюю поверхность гранул геля сефарозы 4В отличают крупные поры, поэтому она доступна как для молекул лигандов, так и для молекул выделяемых веществ. Частицы сефарозы мало сжимаемы, что обеспечивает хорошие гидродинамические свойства процесса хроматографии.

Сефароза CL — это ковалентно сшитые 2,3-дибромпропаном в щелочной среде молекулы агарозы (2В, 4В, 6В). Сефароза CL устойчива в органических растворителях, что имеет значение для последующей иммобилизации лиганда при повышенных температурах в присутствии денатурирующих агентов (мочевина, гуанидин гидрохлорид). По сравнению с сефарозой 4В сшитая агароза обладает меньшей емкостью.

Аффи-гели (биогели) — агарозные и полиакриламидные гели, модифицированные разнообразными функциональными группами. По сравнению с агарозными гелями сорбенты на основе полиакриламида имеют следующие преимущества: крайне незначительную неспецифическую сорбцию; биологическую инертность (устойчивы к действию ферментов); повышенную термическую и химическую устойчивость.

Перед присоединением лиганда, содержащего аминогруппу, проводят активирование сефарозы бромцианом:



Сефароза легко разрушается под действием химических соединений и микроорганизмов, поэтому можно использовать более стабильные макропористые носители: кремнезем, силикагель, органические полимеры.

«Ножка» отдаляет лиганд от сорбента, устраняя пространственные затруднения, возникающие при взаимодействии лиганда с бел-

ком. В качестве соединяющих звеньев используют полиамины, ω -аминокислоты, пептиды, олигосахариды. Не всегда удается поддерживать инертность «ножки» в процессе хроматографирования, так как возможно образование катионных группировок, типа изомочевины, и изменение свойств сорбента.

Наиболее сложен выбор биоспецифического лиганда, который должен обладать обратимым сродством к молекуле фермента. Такой лиганд должен содержать химические группы, посредством которых будет иммобилизован на матрице без нарушения активности по отношению к белку. Если хроматографию проводят на катионите, то лиганд должен иметь отрицательный заряд, а при очистке на анионите — положительный. Во время элюции белка концентрация лиганда должна поддерживаться в пределах 0,1–10 мкмоль на 1 г влажного сорбента. В качестве лигандов, как правило, применяют ингибиторы ферментов, которые более устойчивы к превращениям, чем субстраты. Так, для выделения протеиназ применяют нерасщепляемые ими пептиды D-аминокислот. Можно применять лиганды, которые связывают большие группы родственных ферментов (киназ, дегидрогеназ), например антрахиноновые красители или аналоги НАД.

Производные фенилборной кислоты, используемые как лиганды, имитируют при взаимодействии с ферментом структуру переходного комплекса с субстратом. Такие лиганды эффективны при выделении сериновых гидролаз.

Использование в качестве лигандов антител, обладающих специфичностью именно к тем белкам, против которых они получены, позволяет провести высоко избирательный процесс *иммуносорбции* и выделить препараты, более чистые, чем при использовании других типов аффинных адсорбентов [23, 24]. Сложность получения антител ограничивает внедрение этого метода выделения белков.

Используя специальные элюенты, можно изменить сродство лиганда к ферменту, провести десорбцию белка и получить препарат высокой степени чистоты. Обычно в качестве подвижной фазы используют углеводороды (гексан, гептан, изооктан, циклогексан) с добавлением небольших количеств хлороформа, изопропилового спирта, диизопропилового эфира.

Аффинная хроматография может применяться для выделения и концентрации различных веществ белковой природы: ферментов, структурных белков, иммуноглобулинов, липопротеинов, гликопротеинов,

рекомбинантных белков, белков-переносчиков. Этот метод может применяться также для выделения гормонов и их рецептов, кофакторов (при этом роль лигандов играют ферменты); антигенов, вирусов, клеток и их органелл и других биологически активных веществ. Некоторые примеры использования аффинной хроматографии приведены в таблице. Применение разнообразных носителей, лигандов, необходимость иммобилизации лигандов обусловлены различной природой выделяемых веществ [25].

Использование аффинной хроматографии для выделения БАВ

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды
Антитела		
против аденозин-5-монофосфата	Олигоадениловые кислоты	Сефароза 4В с 6-аминогексановой кислотой
против адренокортико-тропного гормона (АКТГ)	Синтетический фрагмент (1–24) АКТГ	BrCN-активированная сефароза 4В
против белков миеломы	Специфичные белки 315 и 460	Сефароза
против амилоидного белка фибрилл	Амилоидный белок фибрилл	Сефароза 4В
различных иммуноглобулинов (в частности, клонового IgG)	Клоновый IgG, сополимеризованный с бычьим сывороточным альбумином	Биогель Р-300 или сефароза
Антигены и гаптены		
альбумин (человека)	Альбуминовые антитела	Антитела, полимеризованные хлоругольным эфиром
глюканоподобная иммуно-реактивность	Антитела к панкреатическому глюкагону	Сефароза 4В
β-антиген гепатита	Конканавалин Л	Сефароза

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды
защитный антиген против сибирской язвы	Антитело	Полистирол
Клетки и клеточные органеллы	Инсулин	Сефароза 4В
жировые клетки		
антигаптенные специфические лимфоциты	Азофенил-β-лактозидные гаптеносодержащие группы	Биогель Р-6 с гистамином
бактериофаг SKV1	Липополисахариды из <i>Shigella sonnei</i>	BrCN-активированная сефароза 4В или эпоксиактивированная сефароза 6В
Кофакторы и витамины	Авидин	Сефароза 4В
биотин		
кофермент А	Аффинный к коферменту А белок	Сефароза 6В
флавинадениндинуклеотид	п-Ацетоксимеркурианилин	Сефароза 6В
Ферменты	Триметил-(м-аминофенил)аммоний хлорид хлогидат	Биогель А-50m с 3,3'-диамино-дипропиламином и янтарным ангидридом, дважды присоединенным
ацетилхолингидролаза		
β-галактозидазы	Конканавалин А	Конканавалин А-сефароза
аденинтрифосфатаза (митохондриальная)	Ингибитор аденинтрифосфатазы	Сефароза 4В

Основанная на специфических биологических взаимодействиях аффинная хроматография отличается высокой избирательностью и дает возможность получить чистый белковый препарат однократным хроматографированием. Однако в настоящее время распространение метода аффинной хроматографии для промышленного производства ферментов ограничено, что объясняется сложностью процесса подбора сорбента и лиганда.

Для очистки высокомолекулярных соединений, прежде всего нестабильных веществ белковой природы, используется также метод **эксклюзионной хроматографии**. В этом методе выделение (очистка) веществ основано на неодинаковой способности молекул разного размера (молекулярной массы) проникать в межмолекулярное пространство неподвижной фазы. Разделение молекул по размерам и форме основано на свойствах молекулярного сита, которыми обладают многие пористые материалы. Наиболее часто для этой цели применяют органические полимеры с трехмерной сетчатой структурой, придающей им свойства гелей. Поэтому метод эксклюзионной хроматографии принято называть гель-фильтрацией.

В качестве носителя чаще всего используют гели, полученные на основе декстрана, состоящего из поперечно-сшитой трехмерной молекулярной сетки. Такие частицы обладают высокоразвитой пористой структурой. Для удобства заполнения колонок гели формируют в виде гранул. Пores гелей недоступны для крупных молекул, но легко заполняются мелкими молекулами.

Принцип гель-фильтрации изображен на рис. 31. В колонке с гелем часть молекул находится в пространстве между гранулами геля, а часть находится в порах. При пропускании анализируемого раствора через колонку первыми выходят наиболее крупные молекулы, способные проникать в минимальное число пор неподвижной фазы. Последними выходят низкомолекулярные вещества, свободно проникающие в поры. Механизм процесса — исключение по размеру (size exclusion) — нашел отражение в названии метода. Гель в этом процессе выполняет функцию молекулярного сита.

Гель-фильтрация — одна из форм распределительной хроматографии, причем в отличие от сорбционной хроматографии при эксклюзионной хроматографии подвижная фаза остается химически и сорбционно инертной и с разделяемыми веществами практически не взаимодействует. Особенностью метода является возможность раз-

деления молекул по их размеру в диапазоне почти любых молекулярных масс, что делает его практически незаменимым при исследовании биополимеров.

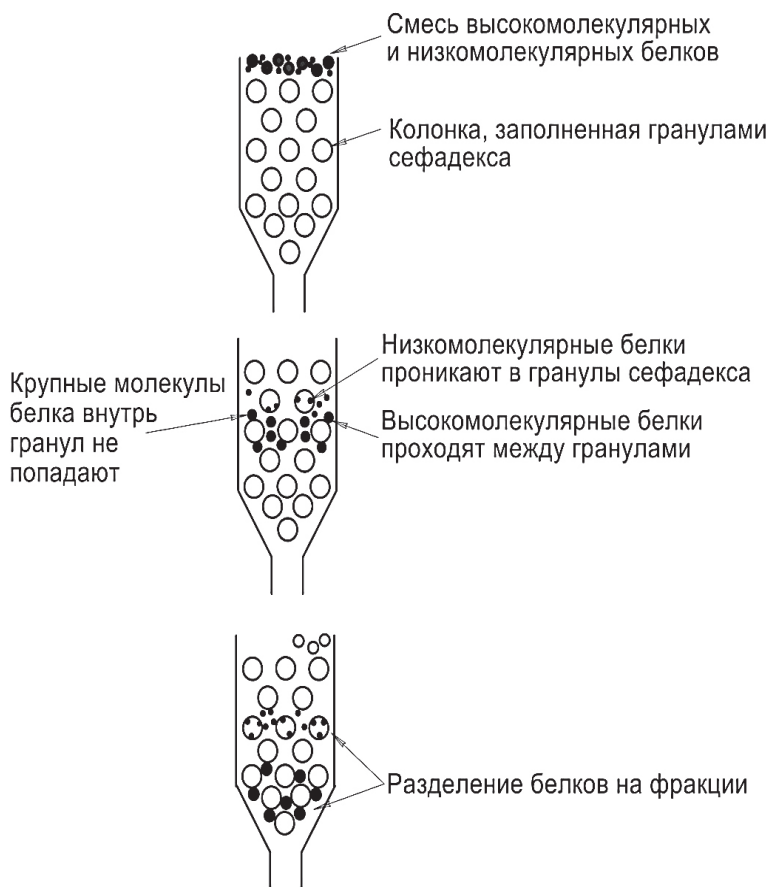


Рис. 31. Разделение смеси белков методом гель-фильтрации

Гель-фильтрация дает возможность провести разделение быстро и получить продукт высокой степени чистоты. Поэтому представляется перспективным применение этого метода на заключительных стадиях очистки белковых препаратов не только в лабораторных, но и в производственных условиях.

В **заключение** стоит отметить, что сорбционные методы выделения и очистки можно применять для продуктов биотехнологии различной природы и химической структуры. Наряду с приведенными выше при-

мерами известны технологические схемы получения органических кислот, витаминов, полисахаридов, в которых присутствуют стадии ионообмена и молекулярной сорбции.

Таким образом, сорбционный метод является достаточно универсальным и обладает рядом преимуществ:

- большая степень селективности при выделении;
- высокая степень очистки и, следовательно, высокое качество продуктов;
- исключается применение дорогих органических растворителей;
- экологическая чистота процесса;
- простые по конструкции аппараты;
- низкая себестоимость производства;
- возможность выделения продуктов непосредственно из культуральных жидкостей.

Список библиографических ссылок

1. Жолнин А. В. Общая химия : учебник / под ред. В. А. Попкова, А. В. Жолнина. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. 400 с.
2. Самсонов Г. В. Сорбция и хроматография антибиотиков. М. ; Л. : Изд-во Акад. наук СССР, 1960. 175 с.
3. Ионообменные материалы, их синтез и свойства / Е. И. Казанцев [и др.]. Свердловск : Издание УПИ, 1960. 146 с.
4. Сенявин М. М. Ионный обмен в технологии и анализе неорганических веществ. М. : Химия, 1980. 271 с.
5. Айвазов Б. В. Практическое руководство по хроматографии. М. : Высшая школа, 1968. 278 с.
6. Демин А. А., Чернова И. А., Шатаева Л. К. Ионообменная сорбция биологически активных веществ. СПб. : Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2008. 54 с.
7. Бирюков В. В. Основы промышленной биотехнологии : учеб. пособие. М. : КолосС, 2004. 296 с.
8. Гальперин Н. И., Ключева Л. М., Торгованова Т. В. Современное состояние аппаратурно-технологического оформления процессов извлечения веществ из растворов ионообменными смолами. М. : ЦБНТИмедпром, 1974. 32 с.
9. Процессы и аппараты химической промышленности / П. Г. Романков [и др.]. Л. : Химия, 1989. 560 с.
10. Новый справочник химика и технолога. Процессы и аппараты химической технологии. СПб. : НПО «Профессионал», 2004. Ч. II. 848 с.
11. Цюрупа М. П., Даванков В. А., Селеменев В. Ф. Изучение сорбции окрашенных продуктов лизинокислого производства на сверхсшитых сорбентах // Прикладная биохимия и микробиология. 1985. Т. 21, № 1. С. 7225–7274.
12. Способ разделения фосфолипидов : пат. 2169734 Рос. Федерация.
13. Способ получения иммобилизованной глюкоамилазы : пат. 2181770 Рос. Федерация.

14. Промышленный регламент по получению канамицина моносульфата. Курган : АКО «Синтез», 1989.
15. Способ выделения антибиотика и устройство для его реализации : пат. 2117699 Рос. Федерация.
16. Пассет Б. В., Воробьева В. Я. Технология химико-фармацевтических препаратов и антибиотиков. М. : Медицина, 1977. 430 с.
17. Ключева Л. М., Вайсберг А. Д. Применение ионообменных смол для выделения и очистки эритромицина. Успехи в области изучения и производства антибиотиков // Труды института ВНИИА. 1970. Вып. 5. С. 37–41.
18. Маршрутная технология по получению эритромицина сорбционным методом. Курган : АКО «Синтез», 2004.
19. Способ выделения цефалоспорины С : пат. 2241039 Рос. Федерация.
20. Мартынова М. А., Таранцева К. Р., Яхкинд М. И. Применение молекулярной сорбции при выделении биосинтетических пенициллинов // Биофармацевтический журнал. 2013. Т. 5, № 1. С. 21–26.
21. Мартынова М. А., Таранцева К. Р., Яхкинд М. И. Молекулярная сорбция бензилпенициллина с применением сорбентов на основе стирола и дивинилбензола с модифицированной структурой // Биофармацевтический журнал. 2013. Т. 5, № 1. С. 26–34.
22. Кисиль Н. Н., Тырсин Ю. А. Новые аспекты ионообменного выделения и осветления антибиотика полимиксина // Сорбционные и хроматографические процессы. 2014. Т. 14, № 5. С. 939–947.
23. Грачева И. М., Кривова А. Ю. Технология ферментных препаратов. 3-е изд. М. : Элевар, 2000. 512 с.
24. Конюхов В. Ю. Хроматография : учебник. М. : Лань, 2012. 222 с.
25. Туркова Я. Афинная хроматография. М. : Мир, 1985, 472 с.

Список рекомендуемой литературы

1. Бирюков В. В. Основы промышленной биотехнологии : учеб. пособие / В. В. Бирюков. Москва : КолосС, 2004. 296 с.
2. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов / И. М. Грачева, А. Ю. Кривова. 3-е изд. Москва : Элевар, 2000. 512 с.
3. Грачева И. М. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и жиров / И. М. Грачева, Н. М. Гаврилова, Л. А. Иванова. Москва : Пищевая промышленность, 1980. 448 с.
4. Демин А. А. Ионнообменная сорбция биологически активных веществ / А. А. Демин, И. А. Чернова, Л. К. Шатаева. Санкт-Петербург : Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2008. 154 с.
5. Елинов Н. П. Основы биотехнологии / Н. П. Елинов. Санкт-Петербург : Наука, 1995. 600 с.
6. Конюхов В. Ю. Хроматография : учебник / В. Ю. Конюхов. Москва : Лань, 2012. 222 с.
7. Навашин С. М. Антибиотики группы аминогликозидов / С. М. Навашин, И. П. Фомина, Ю. О. Сазыкин. Москва : Медицина, 1977. 211 с.
8. Пассет Б. В. Технология химико-фармацевтических препаратов и антибиотиков / Б. В. Пассет, В. Я. Воробьева. Москва : Медицина, 1977. 430 с.
9. Сазыкин Ю. О. Аминогликозидные антибиотики. Проблемы создания новых препаратов / Ю. О. Сазыкин, А. В. Швеиц, В. П. Иванов // Антибиотики и химиотерапия. 2000. № 6. С. 3–6.
10. Самсонов Г. В. Сорбция и хроматография антибиотиков / Г. В. Самсонов. Москва ; Ленинград : Изд-во Акад. наук СССР, 1960. 175 с.
11. Самсонов Г. В. Сорбционные и хроматографические методы физико-химической биотехнологии / Г. В. Самсонов, А. Т. Меленевский. Ленинград : Наука, 1986. 230 с.
12. Фритц Дж. Ионная хроматография / Дж. Фритц, Д. Гьертде, К. Поланд. Москва : Мир, 1984. 221 с.

Оглавление

Предисловие.....	3
Введение	4
1. Основные сведения о процессе сорбции.....	6
Вопросы для самопроверки.....	9
2. Основы ионного обмена	10
2.1. Особенности обмена ионов на ионитах	11
2.2. Ионообменное равновесие	13
2.3. Свойства ионитов.....	14
2.4. Классификация ионообменных материалов.....	16
Вопросы для самопроверки.....	20
3. Синтез ионообменных смол	21
4. Современные подходы к синтезу и структуре ионообменных материалов для сорбции биологически активных веществ	31
Вопросы для самопроверки.....	37
5. Практика проведения процессов ионообмена.....	38
5.1. Основные режимы процессов ионообменной сорбции	38
5.2. Аппаратурное оформление процесса ионообмена непрерывным способом	42
Вопросы для самопроверки.....	51
6. Применение сорбционных методов для выделения и очистки продуктов биосинтеза.....	52
6.1. Применение молекулярной сорбции	52
6.2. Применение ионного обмена для выделения и очистки биологически активных веществ	53
6.3. Применение аффинной хроматографии	67
Список библиографических ссылок	76
Список рекомендуемой литературы.....	78

Учебное издание

Берсенёва Вера Сергеевна
Бакулев Василий Алексеевич

СОРБЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ БИОСИНТЕЗА

Редактор Т. Е. Мерц
Верстка Е. В. Ровнушкиной

Подписано в печать 17.10.2018. Формат 70×100 1/16.
Бумага писчая. Плоская печать. Усл. печ. л. 6,5.
Уч.-изд. л. 4,0. Тираж 40 экз. Заказ 286.

Издательство Уральского университета
Редакционно-издательский отдел ИПЦ УрФУ
620049, Екатеринбург, ул. С. Ковалевской, 5
Тел.: 8 (343) 375-48-25, 375-46-85, 374-19-41
E-mail: rio@urfu.ru

Отпечатано в Издательско-полиграфическом центре УрФУ
620083, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4
Тел.: 8 (343) 358-93-06, 350-58-20, 350-90-13
Факс: 8 (343) 358-93-06
<http://print.urfu.ru>

